

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**SZÖVETI FEJLŐDÉST, REGENERÁCIÓT,
ÖREGEDÉST ÉS PATOLÓGIÁS
ELVÁLTOZÁSOKAT SZABÁLYOZÓ
INTRA- és INTERCELLULÁRIS
JELÁTVITELI FOLYAMATOK
VIZSGÁLATA EGÉR ÉS HUMÁN
IMMUNSZÖVETI MODELLEKBEN**

PONGRÁCZ JUDIT ERZSÉBET

PTE ÁOK
IMMUNOLÓGIAI és BIOTECHNOLÓGIAI INTÉZET
ORVOSI BIOTECHNOLÓGIA TANSZÉK

2012

dc_267_11

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	7
2.1. AZ IMMUNRENDSZER.....	7
2.2. A SZÖVETI FEJLŐDÉST ÉS DIFFERENCIÁCIÓT SZABÁLYOZÓ MOLEKULACSALÁDOK	8
2.3. WNT JELÁTVITEL	8
2.4. PROTEIN KINÁZ C ENZIM CSALÁD	9
2.5. PKC-K A WNT JELÁTVITELBEN	9
2.6. A TÍMUSZ FIZIOLÓGIÁJA ÉS A WNT-OK	10
3. CÉLKITŰZÉSEK	13
3.1. A PKC IZOFORMÁK AKTIVITÁSÁNAK VIZSGÁLATA PRIMER HUMÁN IMMUNSEJTEKBEN ÉS SEJTVONALAKON	13
3.2. JELÁTVITEL VIZSGÁLATA A FEJLŐDŐ TÍMUSZ SEJTJEIBEN EGÉR MODELLEN	13
3.3. A WNT JELÁTVITEL SZEREPÉNEK MEGISMERÉSE A TÍMUSZ ADIPOID INVOLÚCIÓJA SORÁN	13
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, KÍSÉRLETI MODELLEK	15
4.1. SEJTEK ÉS SZÖVETRENDSZEREK	15
4.2. SEJT- ÉS SZÖVETTENYÉSZETEK	16
4.3. SEJT SPECIFIKUS MOLEKULÁK DETEKTÁLÁSA.....	17
4.4. APOPTÓZIS DETEKTÁLÁSA.....	18
4.5. RNS IZOLÁLÁS, cDNS KÉSZÍTÉS, RT-PCR ÉS Q-RT-PCR	18
4.6. IMMUNPRECIPITÁCIÓ ÉS WESTERN BLOT	19
4.7. ENZIMAKTIVITÁS MÉRÉSE	19
4.8. GÉNEXPRESSZIÓ MÓDOSÍTÁSA.....	20
5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS	21
5.1. PKC-K A MIELOID TÍPUSÚ IMMUNSEJTEK JELÁTVITELÉBEN.....	21
5.2. JELÁTVITEL A TÍMUSZ ORGANOGENEZISE ÉS A TIMOCITÁK FEJLŐDÉSE SORÁN	24
5.3. JELÁTVITEL A TÍMUSZ ATRÓFIÁJA SORÁN	28
6. EREDETI TUDOMÁNYOS FELISMERÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS GYAKORLATI ALKALMAZHATÓSÁGA	31
7. IRODALOMJEGYZÉK	33
8. KÖZLEMÉNYEK.....	39
8.1. PUBLIKÁCIÓS MUTATÓK	39
8.2. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ EREDETI KÖZLEMÉNYEK	39
8.3. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ÖSSZEFOGLALÓK	40
8.4. AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ ELSŐ ÉS UTOLSÓ SZERZŐS KÖZLEMÉNYEK	41
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	43

dc_267_11

1. BEVEZETÉS

A biológiai folyamatokat bonyolult sejten belüli és sejten kívüli jelátviteli hálózatok szabályozzák. Úgy az embrionális fejlődést, mint a felnőtt szövetek napi működését, szöveti regenerációját és öregedését ezek az összetett jeltovábbítási hálózatok irányítják. Nem meglepő tehát, ha a jelátviteli utak hibái patológiás elváltozásokhoz vezetnek. Ezért, a jelátvitel megértése fejlődési rendellenességek és felnőttkori betegségek mechanizmusának feltérképezéséhez nélkülözhetetlen. Ez a tudás szolgál alapjául a terápiás célok azonosításához, farmakológiai hatóanyagok bevizsgálásához és új terápiás módszerek kidolgozásához, illetve akár az öregedés folyamatának lelassításához is.

Ennek ellenére, évtizedeken keresztül még a sejten belüli és sejten kívüli kommunikáció alapját képező molekuláris kapcsolatok biokémiai és genetikai feltérképezése is nehézségekbe ütközött. Amikor végül a technikai problémák megoldódni látszottak, a felhalmozott információ sokszor ellentmondásosnak bizonyult és a kialakult jelátviteli dogmák nem magyarázták a fiziológiásan megfigyelhető folyamatokat. Ekkor vált nyilvánvalóvá, hogy a jelátvitel vizsgálata, a jelátvitel biológiai rendszerekben történő modellezése és a kísérleti eredmények értelmezése alapos átgondolást igényel.

Munkám fő irányvonala együtt evolválódott a jelátvitel megértéséhez nélkülözhetetlen kísérletes megközelítési módokkal és értelmezési koncepciókkal. Kollégáimmal a fenti megfontolások figyelembevételével végeztük jelátviteli kísérleteinket, hogy ez a nagyon bonyolult, és meglepő módon, nagy pontossággal működő biokémiai hálózat fiziológiás szinten történő megértéséhez hozzájáruljunk.

dc_267_11

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az értekezésemben elsősorban azoknak a vizsgálatainknak az eredményeit ismertetem, amelyek során a protein kináz C és a Wnt jelátvitel főbb tulajdonságait és fiziológiás jelentőségét tanulmányoztuk sejtvonalakon, normál tímusz-szöveti modelleken, öregedés során és az immunrendszer patológiás elváltozásaiban.

2.1. Az immunrendszer

2.1.1. Az immunrendszer sejtjei és szerepük

A szervezet védekezési folyamatait az immunrendszer irányítja. Az immunrendszer központi szövetei termelik az immunsejteket és irányítják azok fejlődését, majd érését. A kifejlett immunsejtek általános és specifikus antigénfelismerő képessége biztosítja a fertőzések, illetve daganatos betegségek elleni védelmet. Az immunrendszer fő sejtjes elemeit a természetes vagy veleszületett, illetve a szerzett immunitásban résztvevő kategóriába soroljuk. Mind a természetes, mind a szerzett immunitás sejtjes elemei speciális szöveti mikrokörnyezetben fejlődnek ki, ahol a környezetből származó sejten kívüli jeleket a sejten belüli jelátviteli rendszereik segítségével fordítják le és hasznosítják fejlődésük, differenciálódásuk és aktivációs mechanizmusaik megvalósításához.

Az immunsejtek fejlődéséhez a nyirokszervek biztosítják a szöveti mikrokörnyezetet, melyek között megkülönböztetünk elsődleges és másodlagos nyirokszerveket. Az elsődleges nyirokszerv a csontokban található vörös csontvelő, valamint a szegycsont alatt elhelyezkedő csecsemőmirigy. A vörös csontvelőben jönnek létre az immunsejtek őssejtjei, majd fejlődnek ki a természetes immunitás sejtjei, mint a makrofágok, granulociták és dendritikus sejtek, továbbá a B limfociták, illetve a T limfociták prekursorai, melyek közül a T limfociták a tímuszban (csecsemőmirigy) érik el teljes fejlettségi szintjüket. A másodlagos nyirokszervek: lép, mandulák, nyirokcsomók biztosítják az antigén-specifikus immunválasz és az antigén-specifikus immunsejtek aktiválódásának helyszínét. Immunrendszerünk sejtjei naponta millió számra termelődnek, differenciálódnak és szelektálódnak, illetve lépnek aktív állapotba szervezetünk integritásának védelmében. Nem meglepő tehát, hogy az immunsejtek kifejlődésében vagy aktiválódásában fellépő zavarok súlyos következményekkel járnak. Az osztódási zavarok proliferációs betegségek – pl. akut vagy krónikus mieloid leukémia, limfoblasztos leukémia stb.- kialakulását idézik elő. A specifikus szelekciós folyamatokban fellépő zavarok az immunrendszer saját struktúráival szemben kialakult toleranciájának megszűnéséhez vezetnek, amely autoimmun kórképek kialakulását eredményezi. Az immunrendszer fokozott „érzékenysége” is a specifikus immunitás zavaraira vezethető vissza, amely minimális környezeti ingerekre fokozott válaszadás kialakulását eredményezheti és allergiás megbetegedések kialakulásához vezet. Az immunrendszer válaszadási képességének teljes vagy részleges megszűnése pedig a fertőzések megállíthatatlan ismétlődésével vezet a beteg korai halálához.

Annak érdekében, hogy hatékony terápiás módszerek, specifikus gyógyszerek előállítására lehetőség nyíljon, az immunszövetekben zajló folyamatok megértése, mind szöveti, mind sejtek közötti, mind sejten belüli jelátviteli szinten nagy fontossággal bír.

2.1.2. Az immunrendszer öregedése

Az immunrendszer öregedése a szervezetben zajló fiziológiás öregedési folyamatokkal párhuzamosan jelenik meg és vezet különböző szintű immunhiányos állapotok kialakulásához. Az egyedi immunológiai kompetenciát a primer limfoid szervekben fejlődő specializált érett limfociták és a másodlagos nyirokszervekben vagy a fertőzés helyén funkciójukat beteljesítő érett nyiroksejtek jelentik. Érthető módon, ha a szöveti mikro környezet megváltozik, az döntő módon befolyásolja mind a primer, mind a szekunder immunválaszt. Az immunszövetek öregedésének vizsgálata során már kimutatásra került, hogy mind a B, mind a T limfociták szöveti környezete öregszik. Az öregedési folyamatok jellemzője pl a limfoid memória sejtek túléléséhez szükséges szöveti kapcsolatokból származó jelek hiánya (Aydar, Balogh et al. 2004) (Aydar, Balogh et al. 2003), avagy a T limfociták termelésének lecsökkenése a thímusz szövet atrofijának következtében. Összességében az öregedés következtében bekövetkező változások autoimmun betegségek kialakulásához és fertőzésekkel szembeni válaszképtelenséghez vezethetnek.

2.2. A szöveti fejlődést és differenciációt szabályozó molekulacsaládok

Mind az embrionális fejlődést, mind a felnőtt szövetek homeosztázisát olyan sejten belüli jelátviteli útvonalak szabályozzák, melyeket közvetlen és közvetett sejt-sejt közötti kölcsönhatások kontrollálnak. Noha egy-egy sejt válaszadó képessége igen széles skálán mozog, a fejlődést, regenerálódást és az öregedés folyamatát csak néhány, fő jelátviteli molekula, illetve molekula család szabályozza. Köztük a csont morfogén fehérje, azaz „bone morphogenic protein” (BMP), a transzformáló növekedési faktor, azaz a „transforming growth factor β ” (TGF β), a fibroblaszt növekedési faktor, azaz „fibroblast growth factor” (FGF), a Notch és a Wnt gliko-lipoprotein család játsza a legfontosabb szerepet. A Wnt molekula család elemei esszenciálisak az embrionális fejlődés, a felnőtt szövetek folyamatos regenerációja és őssejt állományának fenntartása szempontjából. A Wnt jelátvitel hibás szabályozása daganatok, fibrózis és perzisztáló gyulladásos folyamatok kialakulásához, illetve felgyorsult öregedéshez vezet (Nateri, Spencer-Dene et al. 2005; Liu, Fergusson et al. 2007). Mivel kutatásaim jelentős részét a Wnt jelátvitel vizsgálatával töltöttem, ezért a Wnt jelátvitelt részleteiben mutatom be.

2.3. Wnt jelátvitel

2.3.1. A Wnt jelátvitel általános jellemzői

Maga a Wnt elnevezés a *Drosophila* „wingless” (szárnyatlan) és annak gerinces homológja az „Int” összevonásából keletkezett. A gerincesek 19 Wnt fehérjéje bizonyítottan központi szerepet játszik a sejt differenciálódás, sejtosztódás, sejt migráció és sejt polaritás szabályozásában. A Wnt-ok ciszteinben gazdag, szekretált gliko-lipoproteinek, amelyek jeltovábbítása két fő és ezeken belül is több alcsoportot alkotó, bonyolult jeltovábbítási mechanizmusra osztható. A Wnt fehérjék a Ryk (Kim, Her et al. 2008), illetve a Frizzled (Fz) elnevezésű receptorokhoz kötődve indítják el a jelátvitelt. A 9 gén által kódolt 10 Fz fehérje az LRP5/6 (low density lipoprotein related protein) ko-receptorral alkot aktív receptor komplexet (Pinson 2000).

A Wnt-ok két fő jeltovábbítási rendszer aktiválásával szabályozzák a génátíródást. Az egyik a klasszikus, avagy kanonikus jelátviteli út, amely β -katenin függő. A másik, a nem-kanonikus út, mely további két jelátviteli útra osztható: a PCP (polar cell polarity) avagy a c-Jun N-terminális kináz (JNK) függő és a protein kináz C (PKC) függő jelátviteli utakra. Attól függően, hogy kanonikus vagy nem-kanonikus jeltovábbítási rendszereket aktiválnak, a Wnt fehérjék két csoportra oszthatók: a kanonikus (Wnt1, Wnt3, Wnt7b, Wnt10b, etc) és a nem-kanonikus (Wnt4, Wnt5a, Wnt11) Wnt-okra. A Wnt rendszer bonyolultságát tovább növeli, hogy a Wnt molekulák receptor specificitása nem abszolút, és így több jeltovábbítási rendszert is aktiválhat egy fajta Wnt fehérje, ami a Wnt-rendszerektől függő celluláris folyamatok vizsgálatát igencsak megnehezíti.

A Fz6 receptorból nem csak aktiváló, hanem gátló jelek (Golan, Yaniv et al. 2004) is kiindulhatnak, amelyek megakadályozzák a TCF függő génátíródást.

2.4. Protein kináz C enzim család

A protein kináz C (PKC) szerin/treonin kináz család prototípusát először Nishizuka kutatócsoportja írta le (Takai, Kishimoto et al. 1979). Elsőként bizonyították, hogy a PKC-kat diacilglicerol (DAG) aktiválja, amely a foszfatidilinozitol természetes bomlásterméke (Kishimoto, Takai et al. 1980). További kutatások arra is fényt derítettek, hogy a tíz izoformából álló PKC család (Ono, Fujii et al. 1988) a tumorképződést indukáló forbolészterek intracelluláris receptora.

A PKC izoformák három fő csoportba oszthatók struktúrájuk és ko-faktor szükségletük alapján: a klasszikus vagy cPKC (α , β I, β II, és γ), a novel vagy nPKC (δ , ϵ , η , θ), és az atipikus vagy aPKC (ζ és ι/λ) csoportba. Az aktivációhoz a PKC család minden tagjának szüksége van foszfatidilszerinre. A cPKC-k ezen túlmenően érzékenyek a kalcium (Ca^{2+}) szintre és szükségük van még DAG-ra vagy forbolészterre (pl 12-tetradecanoyl-13-phorbol acetate, azaz TPA) az aktivációhoz. Az nPKC-k függetlenek a Ca^{2+} -tól, de DAG vagy forbolészter jelenléte nélkül nem aktiválhatók. Az aPKC-knak pedig elegendő a foszfatidilszerin a maximális aktiválási szint eléréséhez. Az izoformák jellemző domén szerkezete lehetővé teszi, hogy a C kinázok működését aktiváló és gátló molekulák széles skálája szabályozhassa (Mellor és Parker 1998).

2.5. PKC-k a Wnt jelátvitelben

A Wnt molekulák két, már korábban részletezett jelátviteli útvonal a β -katenin függő kanonikus és a JNK és PKC függő nem-kanonikus jelátviteli úton keresztül szabályozzák a génátíródást és ezáltal a különféle sejtfunkciókat. Ezen felosztás arra az időre vezethető vissza, amikor még a mainál is kevesebb ismerettel rendelkezünk a Wnt-ok jelátviteléről. Azóta nyilvánvalóvá vált, hogy a Wnt eredetű jelátvitel komplex szabályozásának része a jelátviteli utak hálózatszerű összekapcsolódása és az, hogy bizonyos jelátviteli molekulacsaldok nem rendelkeznek kizárólagosan egyik vagy másik Wnt aktiválta jelátviteli úthoz. A kalcium függő és a JNK planáris cell polaritási kaszkádok kapcsolódási pontjaként már sikerült meghatározni a PKC aktiválta cdc42 (Schlessinger, McManus et al. 2007) molekulát, mely a Wnt jelátviteli rendszerek szoros kapcsolatát bizonyítja. Eddig konkrétan a PKC α (Kuhl, Geis et al. 2001), PKC ζ (Ossipova, Bardeesy et al. 2003), és PKC δ (Kinoshita, Iioka et al. 2003) izoformák specifikus szerepét sikerült bizonyítani. A PKC δ -ról kiderült, hogy azon túlmenően, hogy Wnt5a stimulus hatására transzlokálódik a plazmamembránba, a Dvl foszforilációjában és ezért a Wnt receptorból való jelátvitelben

fontos szerepet játszik. A PKC ζ viszont a GSK-3 β foszforiláció-függő aktiválásában vesz részt. GSK-3 β aktivációja a β -katenin proteosomális degradációját (Moon, Bowerman et al. 2002) szabályozza, és ezzel a kanonikus Wnt jelátvitel gátlását eredményezi. A mieloma plazma sejtek inváziójának és migrációjának vizsgálata során derült fény arra, hogy a Wnt molekulák képesek a β -katenint megkerülve is szabályozni a RhoA migrációt indukáló aktivitását a PKC α , β , és μ izoenzimeken keresztül (Qiang, Walsh et al. 2005).

2.6. A tímusz fiziológiája és a Wnt-ok

2.6.1. A tímusz anatómiája és fő funkciói

A tímusz páros lebenyes szerv, a szegycsont alatt helyezkedik el és a harmadik garattasakból fejlődik ki (Manley 2000). Egér embriókban a tímusz-kezdemény már a 10. embrionális nap körül (E10.5) láthatóvá válik. A tímusz organogenezisét számos szekretált molekulacsalád szabályozza. Míg az epiteliális sejtek osztódásához elengedhetetlenek az FGF (Jenkinson, Jenkinson et al. 2003), addig a tímusz epiteliális karakter kialakításához a Wnt család tagjai szükségesek (Balciunaite, Keller et al. 2002). A tímusz fő szerkezeti egységei a lebenyek, melyeken belül a tímusz epiteliális sejtek hálózata alkotja a kortextet és a medullát.

A tímusz epiteliális sejtek által alkotott hálózatán belül a limfoid progenitorokból fejlődnek ki a T-sejtek, melyek a tímuszt elhagyva, a perifériás immunszövetekben fejezik be fejlődésüket és érnek funkcionálisan aktív immunsejttekké. A humán tímuszban – az egéréhez hasonlóan – az epiteliális sejtek igen fontos szerepet töltenek be a timociták fejlődésének szabályozásában. Kemokineket, mint pl CCL21 és CCL25 termelnek, melyek a csontvelőből a tímuszba vonzzák a limfoid progenitorokat (Liu, Ueno et al. 2005). Citokineket is szekretálnak, mint pl IL7 (Chantry, Turner et al. 1989; Zamisch, Moore-Scott et al. 2005) és IGF (Kecha, Brilot et al. 2000), melyek esszenciálisak a fejlődő T-sejtek túléléséhez és osztódásához (Érson, Owen et al. 1994; Anderson és Jenkinson 1995). A T-sejt progenitorok a tímuszba lépve a több lépcsős fejlődésen esnek át, amikor még nem expresszálnak CD4 és CD8 koreceptorokat, azaz kettősen (double) negatívak (DN). A korai fejlődési állapotban lévő timociták CD44 és CD25 markerek expressziós változásai alapján különíthetők el és oszthatók négy jól definiálható fejlődési csoportba (DN1-DN4). A proliferációs és differenciációs lépéseket követően CD4⁺8⁺, azaz „double” pozitív (DP) timocitákban az átrendeződött T sejt receptor β és α láncok génjei antigén felismerő receptorokká alakulnak, majd a sejtek TCR-k antigén felismerőképessége alapján szelekciós lépéseken esnek át. A funkcióképes TCR alapján a kortikális és medulláris epiteliális sejtek, illetve a dendritikus sejtek a fejlődő T-sejtek közül eliminálják a funkcióképtelen, illetve a potenciálisan autoreaktív sejteket (Anderson MS, Venzani ES et al. 2005).

2.6.2. Wnt-ok a tímuszban

A Wnt jelátvitel vizsgálata kezdetben a T-sejtek fejlődésére koncentrált. Kezdeti kísérletek bizonyították, hogy a tímuszban a szolubilis Fz receptorokkal manipulált Wnt jelátvitel (Staal 1999; Mulroy 2002) a T-sejtek fejlődésében drasztikus változásokat okozott, mind túlélés, mind differenciálódás terén. Nem meglepő módon, hiszen a fejlődő timociták DN3-ból DN4 fejlődési állapotba való lépéséhez β -katenin függő, kanonikus Wnt-ok által aktivált, TCF/LEF transzkripciós faktorok által szabályozott génátíródásra van szükség (Verbeek 1995; Schilham 1998). Későbbi kutatások kiderítették azonban, hogy nem csak a timociták igénylik a Wnt jelátvitelt, hanem a timociták fejlődéséhez elengedhetetlenek tímusz

epitéliális sejtek is, hiszen Wnt jelátvitel szabályozza a tímusz epitélium karakterét meghatározó FoxN1 transzkripció faktor expresszióját (Balciunaite, Keller et al. 2002). A tímusz szövet öregedés során bekövetkező változásai

A tímusz mérete és szerkezete egyéb szerveinkkel ellentétben drasztikusan változik az életkorral. Ötven éves korra már a tímusz szöveti állományának 80%-a adiopoid szövet (Marinova 2005). Ezzel párhuzamosan a még meglévő epitéliális sejtekben csökken a tímusz karaktert fenntartó FoxN1 expresszió. A tímusz epitéliális szöveti állományának elvesztése következtében a korábbi de novo T-sejt-termelési és szelekciós kapacitása lecsökken, amely lehetővé teszi autoimmun kórképek gyakoribb kialakulását és a fertőző, pl. virális eredetű betegségek elleni ellenállóképesség lecsökkenését (Grubeck-Loebenstein 2010).

2.6.3. Wnt-ok az öregedésben

Az őssejtek túlélésének és differenciálódásának fontos szabályozói a Wnt-ok. A legtöbb vizsgálat arra mutatott rá, hogy a drasztikusan lecsökkent Wnt szintek felgyorsult öregedéshez vezetnek, feltehetően az őssejtek depléciójának következtében. Érdekes módon az ellenkező hatás is bizonyítást nyert, mely szerint a Wnt jelátvitel gátlását blokkoló inhibítort, „KLOTHO”-t túlexpresszázó egerek szövetei ugyancsak felgyorsult öregedési folyamaton esnek át (Kuro-o, Matsumura et al. 1997; Liu, Fergusson et al. 2007). Ennek feltehetően az oka, hogy az őssejt állomány a folyamatos osztódás miatt kimerül és a regenerációs folyamatokhoz szükséges sejtforrás kiapad.

2.6.4. Szteroidok hatása a tímusz öregedésre

Kezdetben a fiziológiás, szex szteroidok termelésének megindulását feltételezték a tímusz atrófia kiváltó okaként, hiszen korábbi kutatások az öregedés látható jeleit a pubertást követően azonosították. Ezt a feltételezést látszott alátámasztani, hogy akár sebészeti, akár kémiai kasztrálás eredményeként a tímusz atrófiája drasztikusan csökkent. A szteroid hatás kizárólagosságának látszik ellentmondani azonban, hogy a mostanában végzett vizsgálatok már jóval a pubertás megkezdése előtt behatároltak öregedésre utaló jeleket (LGuatente, Partridge et al. 2008). A szteroidok tímusz öregedésre kifejtett hatása azonban mégis valószínűsíthető, mivel terápiás szteroidok alkalmazásáról is kimutatható, hogy felgyorsult tímusz atrófiához vezet (Blomgren és Éersson 1970; Boersma, Betel et al. 1979; Fletcher, Lowen et al. 2009).

dc_267_11

3. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésemben kitűzött munka célja az immunrendszer és az immunrendszer kifejlődését támogató sejtekben folyó jelátviteli rendszerek megismerése volt.

3.1. A PKC izoformák aktivitásának vizsgálata primer humán immunsejtekben és sejtvonalakon

3.1.1. PKC izoformák aktiválásának és gátlásának módosítási lehetőségei

3.1.2. PKC izoformák neutrofilek aktiválásában és apoptotikus sejthalálában betöltött szerepének megismerése

3.2. Jelátvitel vizsgálata a fejlődő tímusz sejtjeiben egér modellen

3.2.1. TCR-ből származó jelek hatása a T-sejtek fejlődésére

3.2.2. Wnt jelátvitel hatása a T-sejtek fejlődésére a tímuszban

3.3. A Wnt jelátvitel szerepének megismerése a tímusz adipoid involúciója során

3.3.1. A tímusz adipoid degenerációs mechanizmusainak vizsgálata

3.3.2. A PKC-k szerepének vizsgálata az tímusz involúciója során

dc_267_11

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK, KÍSÉRLETI MODELLEK

Kísérleteim során olyan szerteágazó módszertani és technikai repertoárt alkalmaztam, melyek részletezésére nincs mód a jelen keretek között. A leglényegesebbekről tesztek említést, a hivatkozások megjelölésével.

4.1. Sejtek és szövetrendszerek

4.1.1. A kísérletekben felhasznált szövetek forrásai

4.1.1.1. Humán sejtek

Egészséges felnőtt donorok vénás vére szolgált az emberi sejtek forrásául. Az emberi vérből származó neutrofilek kísérletben történő felhasználásához etikai engedéllyel rendelkezünk (University of Birmingham).

4.1.1.2. Egér törzsek és fenntartásuk

A kísérletek egyes csoportjaihoz meghatározott korú embriókra volt szükség, melyeket időzített terhességgel állítottunk elő, a pároztatás napját véve az embrionális fejlődés 0. napjának. Az állatok tenyésztése patogénmentes környezetben történt. „Ad libitum” tápanyag és víz adagolása mellett. A korosodásra váró egereket is a fenti körülmények között tartottuk, miközben semmilyen kezelésben nem részesültek.

Egér törzsek: Balb/c; kettősen (double) MHC I & II $-/-$ (H-2^d) MHC deficiens egér (Grusby, Auchincloss et al. 1993), azaz DK, Bcl2 tg, Balb/c-GFP (Kvell, Czömpöly et al. 2010). Az állatok kísérletben történő felhasználása az etikai szabályok és engedélyek (University of Birmingham illetve a Pécsi Tudományegyetem) figyelembevételével történt.

4.1.2. Egér és humán sejtvonalak és primer sejtek

4.1.2.1. Sejtvonalak

Egér sejtvonalak: Tep1, Tep1-GFP, Tep1-Wnt4-GFP

Humán sejtvonalak: 293T vese epithélium, U937 mielomonocita leukémia (diffúz hisztocitikus limfóma), HL60 promieloid (akut mieloid leukémia)

4.1.2.2. Primer sejtek

Egér: timociták (double negatív (DN), double positive (DP), és single positive (SP) fejlődési alakjai); T-sejt progenitorok, Bcl2 transzgén egerek és MHC I & II $-/-$ (H-2^d) timocitái, timusz epithélialis sejtek (TEC)

Humán: Neutrofil granulociták

4.1.3. Primer humán és egér szövetek

4.1.3.1. Primer humán szövet

Egészséges felnőttek véréből Percoll gradiens centrifugálással (Jepsen és Skottun 1982) neutrofilokat szeparáltunk kísérletes aktiválásra és apoptotikus sejthalál manipulálására.

4.1.3.2. Primer egér szövetek

Embrionális (E12, E14, E15), újszülött (NB), 1, 3, 6, 9, 12, 18 hónapos Balb/c (H-2^d) és Balb/c-GFP egerek tímuszát, illetve májszövetét használtuk a kísérletekben.

4.2. Sejt- és szövettenyészetek

4.2.1. Emberi és egér sejt- és szövetkultúrák fenntartásához alkalmazott tápfolyadék

4.2.1.1. Emberi sejt kultúrák tápfolyadék összetétele

A HL60, U293 sejt vonalakat és a neutrofil inkubációkat 10% FCS-t (foetal calf serum) és 100 µg/ml penicillint, streptomocint és β-merkaptó-etanol (5x10⁻⁵ M) tartalmazó RPMI 1640-ben tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában.

4.2.1.2. Egér sejt- és szövetkultúrák tápfolyadék összetétele

TEP1 (Tanaka, Mamalaki et al. 1993) és 293T sejt vonalakat DMEM médiumban tenyésztettük 10% FCS (foetal calf serum) és 100 µg/ml penicillin, streptomycin és β-merkaptó-etanol (5x10⁻⁵ M) jelenlétében, 37°C-on, 5% CO₂ atmoszférában. A szövettenyészeteket is a fenti médiumban inkubáltuk a kísérletben meghatározott ideig.

4.2.2. Komplex tímusz szövetkultúrák

A tímusz szöveti állománya kollagenázos emésztéssel elemeire bontható, majd újra összeállítható. Az epiteliális sejtek T-sejt fejlődést és szelekciót támogató képessége nem sérül, amennyiben folyamatosan háromdimenziós szöveti kultúrában tartjuk az epitéliumot. A szerv és reaggregátum szerv kultúrák legkönnyebben embrionális tímusz szövetekkel állíthatók elő, de felnőtt tímusz szövetek is felhasználhatók az elkészítésükhöz. A sejt elemekre szétválasztott majd különféle kombinációban újra összeállított háromdimenziós aggregátumokban megmarad a tímusz epitélium T-sejt fejlődést támogató képessége. Ez a technika azért is különösen alkalmas a jelátviteli folyamatok vizsgálatára, mert a sejtekben a gén és fehérje expresszió módosítása könnyen kivitelezhető a tímusz sejt elemek reaggregálása előtt vagy alatt.

Időzített terhességből származó egér embriók tímusz lebenyei eltávolításra kerültek. A lebenyeket ezután vagy deoxiguanozin jelenlétében inkubáltuk, amely a timociták depléciójához vezetett - ekkor az epiteliális sejtek könnyebben tisztíthatók és szabadon felhasználhatók kísérletekben -, vagy a lebenyeket timocita forrásként használtuk fel a reaggregátumok készítéséhez.

4.2.2.1. Tímusz sejtek szeparálása és dúsítása

Tímusz lebenyeket 1mg/ml kollagenázzal 30 percen keresztül emésztettük, majd 10% FCS-t tartalmazó DMEM-mel mostuk. Az epitélium tisztításához a sejt szuszpenziót anti-EpCAM1-FITC (G8.8-as klón) epiteliális marker ellen termeltetett ellenanyaggal inkubáltuk, majd vagy mágneses MACS oszlopon anti-FITC mikrogöngy (Miltenyi Biotec) felhasználásával, vagy MoFlo sejt szorterrel tisztítottuk (Hare, Pongracz J et al. 2003).

Timocita alpopulációkat anti-CD44, anti-CD25, anti-CD8, anti-CD4, anti-CD45, anti-CD69 (Hare, Pongracz et al. 2002) elsődleges ellenanyagokkal és a megfelelő kombinációban alkalmazott másodlagos jelzéssel (FITC, PE vagy APC) Dynalbeads (mágneses elválasztás) vagy MoFlo sejt szorter alkalmazásával választottuk el. Amikor csak timocitákra volt szükség, akkor a tímusz lebenyekből mechanikai úton, a lebenyek felszeletelésével szabadítottuk ki a limfoid sejteket.

4.2.2.2. *Limfoid sejteket nem tartalmazó tímusz lebenyek előállítása*

A E14 illetve E15 napos tímusz lebenyeket szövetkultúrákban inkubáltuk 2-deoxiguanozin jelenlétében (Jenkinson, Éerson et al. 1992). Mivel a 2-deoxiguanozin gátolja a sejtosztódást, a jelenlétében történő inkubálás a gyorsan osztódó timociták depléciójához vezet a 4-5 napos inkubálási periódust követően. Az így előkezelt tímusz lebenyekből az epiteliális és egyéb tímusz stróma sejtek tisztítása CD45-ös depléciót követően igen nagy hatásfokú.

4.2.2.3. *Tímusz reaggregátum kultúrák*

A tisztított sejt kultúrákból 1:4 (timocita:epitélium) arányú keveréket készítettünk, majd vagy centrifugálással (100xg, 5 perc, 4°C, majd 150xg, 5 perc, szobahőn) aggregáltuk (Éerson és Jenkinson 2007), vagy 20 µl-nyi folyadékban függő csepp kultúrát készítettünk. A 12-24 órás inkubálását követően az aggregált tímusz kultúrák stabilizálódtak és 5 ml-nyi médiumban szivacsra helyezett Millipore filteren 5–11 napon keresztül inkubálhatók voltak, amikor is a timociták differenciálódási markereit áramlási citométerrel ellenőrizni lehetett (Pongracz JE, Parnell SM et al. 2006).

4.2.2.4. *Függő csepp (hanging-drop) kultúrák*

Mikrogravitás vagy függő csepp kultúrákat steril műanyagból készült plate-eken (Terasaki plate) állítottuk össze. A Terasaki plate-ek mind 60-lyukú, mint 72-lyukú formátumban készülnek, orvosi tisztaságú polisztrénből. Minden egyes lyuk térfogata kb.10 µl, ezért lyukanként 20 µl-nyi folyadékkal fejjel lefelé fordítva a plate-eket kialakulnak a függő-cseppek, melyeket a kapilláris hatás tart a műanyaghoz rögzítve. Egy ilyen folyadékcsepp-ben a szuszpenzióban levő sejtek lassan leülepednek, és reaggregátumot képeznek. Mivel a kicsi térfogatban a tápanyag mennyisége limitált, amint az aggregátum kialakult, a mikroszövetet nagyobb szövettenyésztő edénybe helyeztük át (Pongracz JE, Parnell SM et al. 2006; Anderson és Jenkinson 2007).

A függő csepp kultúra megkönnyíti a limitált sejtszámú populációkból szöveti aggregátumok készítését, mivel igen kevés sejtszám esetén is használható és manipulálható eljárás.

4.3. Sejt specifikus molekulák detektálása

4.3.1. Citospin

Kezelt vagy kezeletlen neutrofilekből, timocitákból vagy sejtvonalakból (TEP1, U937, HL60) 1×10^6 /ml sejt szuszpenziót készítettünk, majd 100 µl-nyi sejtet vittünk a citocentrifuga sejtartályaiba (300 rpm, 3 perc, 20°C). Centrifugálást, majd szárítást követően a festési eljáráshoz szükség szerint optimalizált fixálási (aceton, metanol, etanol, paraformaldehid) és permeabilizálási (Tween20, vagy szaponin) eljárásnak vetettük alá a sejteket. Ezt követően fehérje specifikus ellenanyaggal jelöltük a kísérlet szempontjából fontos fehérjéket. Immunofluoreszens és konfokális mikroszkópiával végeztük az analízist. Az apoptotikus neutrofileket hematoxilin-eozinnal festett sejt szuszpenzióból mikroszkopikus analízissel morfológia alapján azonosítottuk (Afford, Pongrácz et al. 1992).

4.3.2. Szöveti metszetek

Fagyasztott primer tímuszból vagy reaggregátum kultúrából 8-9 µm vastag metszetek készültek, amelyeket hideg acetonban vagy 4%-os paraformaldehidben fixáltunk (Talaber, Kvell et al. 2011). A metszetek szárítását követően 5%-os bovine serum albumin-nal blokkoltuk (BSA PBS-ben, 20 perc) mielőtt a megfelelő specifikus ellenanyaggal (anti-Ly51-PE (clone 6C3), anti-EpCAM-FITC (clone G8.8), jeleztük a fehérjéket. Amennyiben intracelluláris fehérjék (pl anti-PKC δ) expressziós vagy lokalizációs analízist végeztük, a metszeteket paraformadehides fixálás után szaponinos kezeléssel permeabilizáltuk. A sejtmagot DAPI festéssel, míg a zsírszövetet LipidTOX Red festéssel tettük

láthatóvá. A metszeteket Olympus BX61 mikroszkóppal és AnalySIS szoftverrel analizáltuk (Kvell, Varecza et al. 2010).

4.3.3. Áramlási citometria és szortolás

A sejtfelszíni markerek vagy GFP expresszió alapján határoztuk meg az egyes sejtpopulációk jelenlétét illetve arányait (Pongracz JE, Parnell SM et al. 2006). A sejtfelszíni markerekre specifikus primer ellenanyagok lézerrel gerjeszthető festékekkel direkt konjugált formáit (anti-Ly51-PE, anti-EpCAM-FITC) vagy másodlagos ellenanyagok konjugáltjait alkalmaztuk. A sejteket jégen inkubáltuk az ellenanyagok jelenlétében 30 percig, majd PBS-ben történt mosási lépéseket követően további 30 percig inkubáltuk másodlagos ellenanyag jelenlétében. A sejteket PBS-es mosást követően 0,5%-os paraformaldehidben fixáltuk az áramlási citometria megkezdése előtt. Amennyiben életképes sejtpopulációra volt szükség a további kísérletekhez, úgy a fixálási lépés elmaradt.

4.4. Apoptózis detektálása

4.4.1. Korai apoptózis detektálása

A korai apoptózist annexin festéssel detektáltuk, mivel annexin V nagy affinitással kötődik a membrán foszfolipid foszfatidil-szerinhez, amely a belső membránból a külső membránba transzlokálódik még a DNS fragmentáció megindulása előtt. A sejteket szuszpenzióban direkt FITC-konjugált annexin V-tel inkubáltuk (végső koncentráció: 1 µg/ml), majd áramlási citométerrel 488 nm-nél analizáltuk (Pongracz, Parnell et al. 2003).

4.4.2. Késői apoptózis detektálása

Az apoptózis későbbi stádiumait, amikor a membrán áteresztőképessége fokozódott, propidium jodiddal teszteltük és áramlási citométerrel mértük. A DNS fragmentáció meghatározásához DNS-t tisztítottunk, majd a DNS létrát (apoptotikus fragmentumokat) agaróz gélben szeparáltuk, majd etídium bromiddal, UV fényben tettük láthatóvá. Neutrofil sejtuszuszpenziók esetében az apoptotikus morfológiát mutató sejtek kvantitálása érdekében citospint készítettünk, majd a sejteket hematoxilin-eozin festést követően mikroszkopikus úton analizáltuk (Pongracz, Parnell et al. 2003).

4.5. RNS izolálás, cDNS készítés, RT-PCR és Q-RT-PCR

4.5.1. RNS izolálás, cDNS készítés és végpont RT-PCR

A szöveti vagy sejtes mintákból NucleoSpin RNA clean-up kit felhasználásával került sor RNS izolálásra. A kinyert RNS-ből SuperScript II RNaseH-reverse transcriptase (Invitrogen) kit felhasználásával készült cDNS. Az így kapott cDNS-ből szekvencia specifikus primerek (szekvenciák a közleményekben található) és ReddyMix PCR Master Mix felhasználásával végeztük. A reakcióterméket etídium-bromid jelenlétében, 1%-1,5%-os agaróz gélben szeparáltuk. A gél UV fény alatti elemzése Bio-Rad image analízátor segítségével történt. Belső kontrollként általában β-aktin-t használtunk (Pongracz, Hare et al. 2003).

4.5.2. Q-RT-PCR

A kvantitatív PCR reakciókhoz vagy SYBR green vagy TaqMan módszert alkalmaztunk. A „master mix”-hez gén specifikus primereket adtunk, melyek szekvenciája a csatolt publikációkban megtalálható. A kvantitatív RT-PCR adatok analíziséhez a delta Ct (dCt) és a Relative Quantity (RQ) módszereket alkalmaztuk. Minden minta triplikátumokban került mérésre. A PCR reakciót a disszociációs görbe analízisével ellenőriztük (Kvell, Varecza et al. 2010).

4.6. Immunprecipitáció és Western blot

4.6.1. Immunoprecipitáció

A megfelelő kezelést követően a kísérleti sejttípusokból szuszpenziót készítettünk, majd lízis pufferben (lásd Western blot), jégen inkubáltuk 20 percen keresztül. A kísérlet által megkövetelt ellenanyagot (pl. anti-foszfo-szerin, anti-Bcl2, anti-PKC δ) és protein A Sepharose-t adtunk a lizátumhoz, majd folyamatos rotáció mellett végzett egész éjszakás inkubálást (O/N, 4°C-on) követően a Sepharose gyöngyöket gyors centrifugálással (5", 4°C, 14,000 rpm) összegyűjtöttük, jéghideg TBS (10 mM Tris/HCl, pH 7,8) pufferben mostuk, majd újra szuszpendáltuk 50 μ l TBS-ben +25 μ l 2xSDS-minta pufferben, aztán 3 percig forraltuk, mielőtt centrifugáltuk és SDS-PAGE gélben szeparáltuk. Amennyiben enzimaktivitást kívántunk mérni, úgy a TBS puffer helyett az enzimaktivitás méréséhez szükséges összetételű pufferben szuszpendáltuk fel a Sepharose gyöngyöket (Pongracz, Parnell et al. 2003; Varcza, Kvell et al. 2011).

4.6.2. Western blot

A megfelelő kezelést követően a kísérleti sejttípusokból szuszpenziót készítettünk, majd lízis pufferben (20 mM HEPES pH7.4, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, 137 mM NaCl, 50 mM β -glicerofoszfát, 1% Triton X100 kiegészítve 1mM DTT, 2mM PMSF, 2 μ g/ml leupeptin, 1 μ g/ml aprotinin, 2 mM Na₃VO₄, 0,1 M Na-pirofoszfát, 1 μ M β -mikrocisztin és 10 mM NaF) jégen inkubáltuk 20 percig. Az inkubálást követően a mintákat folyékony nitrogénben lefagyasztottuk és -70°C-on tároltuk felhasználásig. Mielőtt 10% SDS-PAGE-n szeparáltuk a fehérjéket, a mintákat 2xSDS, minta pufferben felforraltuk. A géleket PVDF (Immobilon)-membránra blottoltuk, majd 1% BSA-val blokkoltuk. Ezt követően specifikus ellenanyagokkal megjelöltük a kísérletünk cél-fehérjéjét (pl. anti-foszfo-Akt, anti-foszfo-Bad, anti-Bad, anti-Bcl2, anti- β -katenin, anti-PKC δ vagy β -aktin). Specifikus másodlagos HRP-ellenanyaggal jelöltük a primer ellenanyagot, majd a fehérjéket chemiluminescent „Supersignal kit” segítségével (Pierce) tettük láthatóvá. A mennyiségi összehasonlítást denzitometriás analízissel végeztük (Alpha Imager, Flowgen). Amennyiben γ P³²-ATP beépülését vizsgáltuk, úgy a blottokat megszáritottuk és autoradiográfiának vetettük alá (Pongrácz, Webb et al. 1999; Pongracz, Parnell et al. 2003).

4.7. Enzimaktivitás mérése

4.7.1. PKC izoenzimek, Akt/PKB, PI3K és JNK aktivitásának mérése

A megfelelő kezelést követően neutrofilekből, timocitákból vagy tímusz epiteliális sejtekből került sor enzim fehérjére specifikus ellenanyag felhasználásával az enzim immunprecipitációjára (2 óra, 4°C-on), majd a megfelelő gátló (pl. S33559) és aktiváló (pl. DAG, TPA) kontroll kezelések alkalmazása mellett mértük a γ -³²P-ATP beépülését az enzim specifikus szubsztrátba (Pongrácz, et al. 1999). Más kísérletekben viszont a szubsztrátba beépült radioaktivitás folyadék szcintillációs mérésével határoztuk meg az enzim aktivitását (Griffiths, Garrone et al. 1996; Pongracz, Parnell et al. 2003).

4.7.2. PKC-k autofoszforilációja

A PKC izoenzimek autofoszforilációjának méréséhez a sejtvonalakat 4 órán keresztül 200 mCi/ml [³²P] ortofoszfátot tartalmazó médiumban inkubáltuk, majd PKC izoenzim specifikus ellenanyag felhasználásával immunprecipitáltuk. 8% SDS-PAGE-n végzett elektroforézist követően a géleket megszáritottuk, majd autoradiografáltuk (Griffiths, Garrone et al. 1996).

4.8. Génexpresszió módosítása

4.8.1. Rekombináns vírusok készítése

A rekombináns vírusok megkönnyítik a gének bejuttatását primer sejtekbe, mivel fiziológias folyamatokat használnak a génbevitelre. Míg a retrovírusok osztódó sejteket, addig az adenovírusok nem osztódó, elsősorban epiteliális eredetű sejteket fertőznek meg. A retrovírusok által bejuttatott gének beépülnek a genomba, míg az adenovírusok által bejuttatott gének nem. Mind a rekombináns retro, mind a rekombináns adenovírusok fertőzőképesek, de vad típusú sejtekben osztódni nem tudnak. A vírusok előállításához ezért speciális sejtvonalakra (293A, Phenix) van szükség, amelyek hordozzák a vírusok replikációjához szükséges géneket.

4.8.1.1. Rekombináns retrovírusok

A rekombináns retrovírusok készítéséhez a MIG (MSCV-IRES-GFP) plazmid konstrukciót használtuk, melybe szekvencia specifikus primerek segítségével amplifikált célszekvenciákat klónoztunk. Így készült el a MIG-CMV-IRES-GFP, MIG-CMV-ICAT-IRES-GFP, MIG-CMV-Wnt4 - IRES-GFP és a MIG-CMV-ICNOTCH-IRES-GFP plazmid. Az elkészült vírus plazmidokat tisztítás után 293A sejtvonalba transzfektáltuk Lipofectamine 2000 felhasználásával. A sejtvonal hordozza a vírus replikációjához szükséges szekvenciákat, és a sejtvonalban termelt retrovírusokat a médiumba bocsátja ki. A médiumot három napon át gyűjtöttük, majd felhasználtuk osztódó, primer timociták megfertőzésére (Pongracz, Hare et al. 2003; Pongracz JE, Parnell SM et al. 2006).

A MIG plazmid Prof Warren Pear (Pennsylvania) ajándéka volt a kísérletek kivitelezéséhez. Az ábrán a piros és kék jelek restriktációs helyeket jelölnek, melyek megkönnyítik a restriktációs térkép elkészítését a klónozás során. A bejuttatásra váró géneket „multiple cloning site”-on valamelyik restriktációs hely kiválasztásával úgy klónoztuk, hogy a gént a restriktációs helyekre jellemző „ragadós” véggel készítettük el.

4.8.1.2. Rekombináns adenovírusok készítése

A rekombináns adeno-vírusok készítéséhez a kereskedelmi forgalomban lévő alapvektorokat használtunk (Hare, Pongracz J et al. 2003). Először a „shuttle” vektorba klónoztuk a módosított expressziót igénylő szekvenciát, majd a „shuttle” és „acceptor” vektort homológ rekombinációnak vetettük alá. A homológ rekombinációt követően a vektorokat baktériumokban felszaporítottuk, megtisztítottuk, linearizáltuk, majd a 293A sejtvonalba juttattuk Lipofectamine 2000 segítségével. A sejtvonalban a sikeres transzfekciót követően megfelelő mennyiségű plazmidot hordozó sejtek vírusokat kezdtek termelni. A vírustermelő sejtek elpusztultak és a kiszabaduló vírusok további sejteket fertőztek meg. Így nőtt meg a vírus koncentrációja a felülszóban, amellyel további sejteket fertőztünk meg. A megfelelő mennyiségű fertőzött sejt elérése után a vírusokat kereskedelmi forgalomban is elérhető Ad vírus tisztító kit segítségével tisztítottuk, majd centrifugációs módszerrel, Millipore szűrőket felhasználva koncentráltuk.

A kísérletekhez az alábbi adenovirális vektorokat készítettük: Ad-CMV-CD80-IRES-GFP, Ad-CMV-IRES-GFP.

4.8.2. siRNS kísérleti alkalmazása

Az siRNS avagy a „small interfering RNA” alkalmazása ma már bevett gyakorlat a gén transzkripciót követő, transzlációs folyamatok megakadályozására. Kísérleteinkben kereskedelmi forgalomban elérhető siPKC δ -t használtunk a PKC δ fehérje szint és aktivitás csökkentésének elérése érdekében (Varecza, Kvell et al. 2011).

5. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

5.1. PKC-k a mieloid típusú immunsejtek jelátvitelében

A mieloid típusú sejtek az immunológiai védelem első vonalát képviselik, melynek következtében szerepük elengedhetetlen a természetes immunválasz kialakításában. A mieloid sejtekben kialakuló betegségek ezért megbénítják az immunrendszer működését, amely súlyos, gyakran halálos patológiás folyamatok kialakulásához vezet.

Kezdeti kísérleteinkben a PKC család fiziológiás hatásainak felderítése volt a célunk. A kísérleteinkben alkalmazott aktivátorokat és inhibitorokat az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat

Teljes elnevezés	Rövidítés	Aktivátor	Inhibitor	Cél enzim
12-tetradecanoyl-13-phorbol acetate	TPA	+		PKC család
12-deoxyphorbol-13-phenylacetate	Dopp	+		PKC család
12-deoxyphorbol-13-phenylacetate-20-acetate	Doppa	+		PKC család (PKC β)
thymeleatoxin	THY	+		PKC család
Bistratene A	BisA	+		PKC δ
Staurosporine	SA		+	PKC
Go6976			+	cPKC
Rottlerin			+	PKC δ
Bisindolylmaleimide I	Bis		+	cPKC
PD98059			+	MAPK-ERK1,2
LY379196			+	PKC β
13-Hydroxyoctadecadienoic acid	13-HODE		+	PKC
SB202190			+	p38

5.1.1. PKC izoenzimek szerepének vizsgálata mieloid sejteken gyulladás, proliferációs és apoptotikus folyamatokban

A mieloid sejtek előalakjaiból készített sejtvonalak alkalmasnak bizonyultak a PKC izoenzimek fiziológiás folyamatokban történő jelátviteli szerepének meghatározására.

A kutatásainkban alkalmazott egyik vegyület a 13-HODE. A hydroxylinoleic sav a lipoxigenáz egyik fő metabolitjaként ismert, amelyet a gyulladásos folyamatokban résztvevő mieloid típusú sejtek termelnek a gyulladásos sejtek aktivitásának módosítására.

Kezdeti vizsgálataink során élő sejtekben vizsgáltuk az enzimaktiváció hatására végbemenő fehérjelokalizációs változásokat. Kísérleteinkben a promieloid, HL60-as sejtvonalat és

rekombináns PKC izoformákat használva megállapítottuk, hogy a 13-HODE képes gátolni a PKC α -t, β I-t és β II-t, azaz a klasszikus PKC-kat, de nem befolyásolja a novel PKC δ aktivációját. A kísérletek eredményeként arra a következtetésre jutottunk, hogy a PKC δ a gyulladásos folyamatok jelátvitelében feltehetően nem játszik szerepet.

PKC δ által irányított jelátviteli folyamatok vizsgálatára elsőként a PKC δ aktivációt indukáló Bistratene A (Bis A) elnevezésű polióétert használtuk (Degnan, Hawkins et al. 1989). Bis A hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy ez a vegyület citosztatikus hatással rendelkezik, G2/M(10) fázisban állítva le a sejtosztódást (Griffiths, Garrone et al. 1996). Amennyiben a promieloid HL60 sejtvonalat kezeltük BisA-val, a sejtek megindultak a monocita/macrofág (Watters, Marshall et al. 1990) irányú differenciálódás útján, melyet differenciációs markerek, mint pl a CD11-es molekula expressziójának megjelenésével és az adhéziónak képesség megnövekedésével bizonyítottunk. Kísérleteinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy a klasszikus PKC-kel ellentétben a novel PKC δ elsősorban a differenciálódást irányító jeltovábbításban vesz részt.

Kérdéses maradt azonban, hogy a klasszikus PKC alcsalád minden tagja proliferációt indukáló jeleket továbbít-e, vagy ezek az enzimek szerepet játszanak sejtdifferenciáció vagy apoptózis szabályozásában is? Ennek a kérdésnek megválaszolásához PKC aktivátorokra vagy inhibitorokra volt szükség. Hogy a klasszikus alcsaládba tartozó PKC β izoenzim általános szerepkörét tanulmányozzuk, az U937-es sejtvonal felhasználásával végeztünk kísérleteket a TPA-nál nagyobb enzimspecifitást mutató, PKC β specifikusnak feltételezett forbolészter, Doppa felhasználásával.

A PKC α -t, β -t, δ -t és ζ -t expresszáló U937-es sejtvonalon végzett kísérletekben kimutattuk, hogy a PKC β gyors aktivációja az apoptotikus folyamatok megindulásához vezet, mellyel szemben a sejtek differenciációjához számos PKC izoenzim egyidejű aktiválása szükséges.

Összességében kísérleteink segítségével sikerült arra rávilágítanunk, hogy a PKC izoenzimek egyedileg és enzimszoportokként is részt vesznek specifikus jelátviteli folyamatokban. Továbbá megállapítottuk, hogy a biológiai rendszerek PKC izoenzim összetétele, azok aktivációs szintje, a bejövő jelek erőssége és az enzimek hatásirányának eredője dönti el a fiziológiás válaszképességet. Ennek tükrében azonban felmerült, hogy mennyiben relevánsak a mutáns sejtvonalakon végzett kísérletek, ha az emberi szervezetben, természetes formájukban jelen lévő immunsejtek működését kívánjuk megismerni és terápiás céllal befolyásolni? Hogy közelebb kerülhessünk a PKC-k fiziológiás jelátvitelben betöltött szerepének megértéséhez, sejtvonalak helyett a továbbiakban primer humán neutrofilekben követtük a jelátviteli folyamatokat.

5.1.2. Gyulladásos folyamatok jelátviteli vizsgálata

Neutrofil granulociták a legnagyobb számban jelen lévő fehérvérsejtek a keringésben. A neutrofilek a természetes immunitás igen fontos alkotói, hiszen fertőzések esetén mikrobákat fagocitálnak és pusztítanak el. A fertőzés eliminálása után a neutrofilek apoptózissal elpusztulnak és maradványaikat a makrofágok fagocitálják. Érthető módon, ha a neutrofilek apoptózisa nem, vagy csak késve indul meg, úgy a fertőzésen átesett terület szöveti elemeinek pusztítása tovább folytatódik, mely krónikus szövetkárosodáshoz vezet.

Mivel az aktivált neutrofilek perzisztens jelenléte igen kiterjedt szövetkárosodást eredményezhet, a krónikus gyulladásos folyamatok leállítása terápiás szempontból is igen

fontos cél. A hatékony terápia megtervezéséhez azonban szükséges a neutrofil apoptózis molekuláris folyamatainak megértése, és olyan molekulák megismerése, melyek terápiában való alkalmazásával szabályozhatóvá válnak a neutrofilek aktivációs és apoptotikus folyamatai.

A neutrofil aktivációs folyamatok vizsgálatánál figyelembe vettük, hogy a neutrofil aktiváció egyik fő lépése a NADPH oxidáz aktivációja, mely enzim NADPH felhasználásával katalizálja a reaktív oxigén gyökök termelését. A reaktív molekulagyökök termelése fontos lépés a neutrofilek sejtpusztító képességének kialakulásában. A folyamat főbb lépései a következők: az inaktív neutrofilekben a sok komponensből álló NADPH oxidáz disszociált állapotban van. Sejten kívüli stimuláló jelek hatására az aktivált neutrofilekben megindul az enzim két fő komponensének (p47^{phox} és p67^{phox}) foszforilációja, melynek hatására igen gyorsan asszociálódik az aktív enzim komplex. Ennek eredményeként a neutrofil képessé válik reaktív oxigén gyökök előállítására és sejtpusztító funkciójának betöltésére.

Annak eldöntésére, hogy a PKC-k szerepet játszanak-e a neutrofilek szuperoxid termelésében, forbolészterek és formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP) hatását teszteltük rövid időtartamú, PKC izoenzim aktivációs kísérletekben.

A kísérletekből megállapítható volt, hogy az fMLP kezelés leginkább PKC α és β II aktivációjához vezet, mely leginkább a TPA által indukált izoenzim transzlokációs mintázathoz hasonlít. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy a szuperoxid termelődéséhez vezető folyamatokat klasszikus PKC-k irányítják, feltehetően PKC α . Ez annál is inkább valószínűnek tűnt, mivel a PKC β specifikus Doppa és a PKC δ specifikus BisA kezelés nem vezetett szuperoxid termeléshez.

Hogy további bizonyítékot nyerjünk az izoenzimek szerepéről a neutrofilek szuperoxid termelésében, PKC aktivációt gátló farmakológiai hatóanyagokat alkalmaztunk a kísérleteinkben. Először a neutrofileket PKC inhibitorokkal előkezeltük (Bis, Rottlerin, Go6976 és 13-HODE), mielőtt a sejteket TPA-val vagy fMLP-vel aktiváltuk. Érdekes módon, míg kísérleteinkben a TPA hatását teljes mértékben alátámasztották az inhibitorokkal végzett tesztek, azaz a klasszikus alcsaládba tartozó PKC izoenzimek döntő szerephez jutottak a TPA által indukált szuperoxid termelésben, addig az fMLP receptorból induló jeleket a farmakológiai inhibitorok egyike sem gátolta.

A kísérleti eredményekből arra a következtetésre jutottunk, hogy számos jelátviteli út vezethet a reaktív oxigén gyökök termeléséhez. Mivel számos jelátviteli folyamat befolyásolja a neutrofilek aktivációját, félrevezető lehet a kísérleti rendszerek túlzott leegyszerűsítése és a természetes hatóanyagok eliminálása. A neutrofilek fiziológiás folyamatainak megértéséhez ezért további kísérletekre volt szükség. Kérdéses maradt ugyanis, hogy neutrofilek apoptotikus sejthalálában szerepet játszanak-e PKC függő folyamatok? Ennek a kérdésnek a megválaszolása igen fontos lehet, hiszen a gyulladásos folyamatokban aktiválódó és szövetkárosító neutrofilek eltávolítása fontos terápiás cél.

A neutrofilek apoptotikus folyamatainak vizsgálatára a véráramból frissen eltávolított neutrofileket használtunk. Megállapítottuk, hogy az életképes sejtekkel szemben, az apoptotikus folyamatok megindulásakor PKC β és PKC δ izoenzimok találhatóak a neutrofilek partikuláris frakcióiban, melyből arra következtettünk, hogy ez a két PKC izoenzim fontos szerepet tölthet be a neutrofil apoptózis szabályozásában.

Kísérleteink rámutattak, hogy a PKC δ noha fontos, nem lehet egyetlen eleme az apoptotikus kaszkádnak. Többek között azért, mert a PKC δ -t aktiváló kaszpáz-3-nak is számos egyéb szubsztrátja ismeretes (pl. az apoptózis-specifikus endonukleáz inhibitora, citoszeletális fehérjék, stb.), tehát kizárólag a PKC δ -ra koncentrálnó potenciális terápiás eljárások nem lehetnek hatékonyak.

Noha kutatásaink során sikerült azonosítanunk a PKC család fontos szerepét mind az apoptotikus sejthalál, mind a sejtek túlélése szempontjából, a kísérletekből az is nyilvánvalóvá vált, hogy a szöveti környezetből származó extracelluláris jeleket szorosabb kapcsolatba kell állítani a sejten belüli jelátviteli folyamatokkal ahhoz, hogy terápiás szempontból is alkalmazható ismereteket nyerjünk.

Összességében kísérleteink eredményeként nyilvánvalóvá vált, hogy a szöveti környezet komplex hatása befolyásolja az egyes sejtek túlélését, aktiválódását, illetve halálát kiváltó jelátviteli folyamatokat, melynek behatóbb vizsgálatához összetettebb kísérleti modellre van szükség.

5.2. Jelátvitel a tímusz organogenezise és a timociták fejlődése során

A csecsemőmirigyben, avagy a tímuszban végbemenő sejtes és szöveti változások, mind a szerv kialakulása, mind a benne fejlődő T-sejtek differenciálódása és szelekciója során ideális környezetet biztosítanak a jelátviteli rendszerek vizsgálatára. A tímusz különlegessége az is, hogy a fejlődés, osztódás, differenciálódás és sejthalál ugyanabban a szövetben, párhuzamosan megy végbe úgy, hogy a fenti folyamatokat kiváltó sejtes interakciók illetve szekretált faktorok hatásának eredője szabja meg a szövet minden sejtjének válaszreakcióit.

A tímuszban fejlődő T-sejtek számos fontos osztódási, differenciációs és szelekciós lépésen esnek át. Ezek közül a T sejt receptorhoz (TCR-hoz) kapcsolódik mind a sejtek pozitív, mind negatív szelekciójának folyamata, melynek eredményeként eldől, hogy a periférián milyen TCR repertoárral rendelkeznek majd a T-sejtek.

Kísérleteinkben abból a megfigyelésből indultunk ki, hogy az antigén-MHC komplexet felismerő T-sejtek kapcsolódási erősségének tesztelése elsősorban a tímusz epiteliális sejtjeire háruló feladat. A tímusz epiteliális sejtek ugyanis képesek mind MHCI, mind MHCII expressziójára. A fejlődő timociták a kortikális és medulláris epitéliumon tesztelik először a TCR génátrendeződés eredményeként létrejövő receptor fehérjék antigén és MHC felismerő képességét. Az antigén-MHC-komplexet felismerő TCR-ből származó jeleken túlmenően számos ko-receptor-ligand kapcsolat szabja meg a jel erősségét, amely vagy a timociták túléléséhez vagy apoptotikus sejthalálához vezet.

A TCR-ből származó jelátviteli folyamatok vizsgálatára és annak megállapítására, hogy mekkora erősséggel kötődik a timocita az epitéliumhoz először azt vizsgáltuk, hogy mely molekulákra van szükség ahhoz, hogy a timociták komplexet képezzenek az epitélium membránján található peptid-MHC molekulakomplexszel. *In vitro* kísérletekben TCR α -/-, azaz funkcióképtelen TCR-rel rendelkező timocitákat, és MHC-val nem rendelkező, azaz DK (MHCI/II-/-) epitéliumot használtunk a vad típusú, Balb/c egerekből származó szövetek és sejtek kontrolljaként.

Kísérleteinkben megállapítottuk, hogy a timocitáknak rendelkezniük kell funkcióképes TCR-rel, míg az epiteliális sejteknek MHC-val ahhoz, hogy a szelekciós folyamatok

megindulhassanak. A fenti kísérletben olyan kísérleti rendszer összeállítására került sor, amelyben a timociták válaszreakciói kiválóan nyomonkövethetővé váltak differenciációs markerek segítségével, míg a sejten belüli jelátviteli változások is tesztelhetők maradtak. Megállapítottuk, hogy a timocita-epitélium komplexben az aktív receptor-ligand kapcsolat az aktin citoszkeleton koncentrált polimerizációjával jár mind a timocitákban, mind az epiteliális sejtekben, mely a timocitákban tirozin foszforilációtól függő Ca ion szint növekedéséhez vezet, azaz aktív jelátvitel megindulása észlelhető.

A fenti kísérleti rendszerben aktivált DP timocitákat ez után tímusz reaggregátum kultúrákban inkubáltuk tovább hét napon át. A háromdimenziós (3D) tímusz epiteliális szövet megfelelő mikrokörnyezetet biztosít a T-sejtek teljes kifejlődéséhez. Ebben a mikrokörnyezetben a hét napos inkubációs idő lehetőséget biztosít a T-sejtek kifejlődésére és a pozitív szelekció folyamatának nyomonkövetésére. A fenti kísérleti rendszer alkalmazása egyértelművé tette, hogy az *in vitro* sejtuszuspenzióban epiteliális sejtekkel konjugáltatott timociták olyan túlélési jelet kaptak, ami lehetővé tette a CD4⁺ helper és a CD8⁺ citotoxikus T-sejttekké történő differenciálódásukat, azaz a DP timociták pozitív szelekción estek át. Ez a folyamat a sejtfelszíni markerek karakterisztikus változásával nyomonkövethető volt.

A sejtek egymásrahatásának következtében meginduló pozitív szelekcióhoz vezető folyamatok során számos intracelluláris jelátviteli molekula aktiválódása is megfigyelhető volt. Hogy a molekuláris aktivációt láthatóvá tegyük, a timocita-epiteliális sejt konjugátumban a két sejt közötti kapcsolat helyén sejtfelszíni, és sejten belüli jelátviteli molekulákat jelöltünk meg. A sejtek közötti interakció helyére a CD3, CD45, CD4, CD8 sejtfelszíni és, a p56lck tirozin kináz, LAT adapter protein és PKC θ belső jelátviteli molekulák koncentráálódtak.

Noha számos jelátviteli molekula koncentrálódtott az epitélium-timocita kapcsolat pontjára, ez a folyamat mégis függetlennek bizonyult a „lipid raft”-ok avagy „lipid tutajok” jelenlététől, melyeket korábban elengedhetetlennek feltételeztek az aktív jelátvitel kialakulásához. Az a felfedezés, mely szerint „lipid tutajok” nem alakulnak ki a tímuszban belül fejlődő T-sejtek jelátvitelekor különösen fontosnak bizonyult, hiszen rámutatott a tímuszban zajló TCR-függő szelekciós és a periférián végbemenő TCR-függő aktivációs jelek jeltovábbítási különbségeire.

A jelátviteli különbségeket analizálva feltételeztük, hogy a CD28-B7 (CD80 és CD86) kölcsönhatás, mint ko-stimulációs jel lehet az egyik különbség a perifériás T-sejtek és a fejlődő, DP T-sejtek TCR-függő jelátvitelében között. Különösen fontosnak tűnt ennek a feltételezésnek a vizsgálata, hiszen a tímuszban a kortikális epiteliális sejtek az érett, perifériás antigén prezentáló sejtekkel (APC) ellentétben nem expresszálnak CD80 vagy CD86 ko-stimulációs ligandokat. Az elmélet ellenőrzése kezdetben technikai problémákba ütközött, ugyanis a tímusz epiteliális sejteken szükség volt a fehérjeexpresszió módosítására. További nehézségként merült fel, hogy a sejtfelszínen expresszálatott fehérjéknek funkcióképesnek kellett lenniük, miközben a tímusz epiteliális sejtek életképességét meg kellett őrizni a fehérjeexpresszió módosítását előidéző vektorok bejuttatását követően is. A korábban használt génexpressziót módosító módszerek nem vezettek volna eredményre, mivel a fenti módszerek alkalmazásához a tímusz epitéliumot kétdimenziós kultúrákban kellett volna tenyészteni. Kétdimenziós szövettenyészetekben a tímusz epiteliális sejtek azonban elveszítik azon képességüket, hogy a T-sejtek fejlődését és differenciálódását támogassák. Éppen ezért, végül rekombináns adenovirális (rAd) génbevitelre esett a választásunk, amely igen hatékonyan bizonyult az epiteliális sejtek fehérjeexpressziójának módosításában akár intakt tímusz lebenyek esetében is. Kísérleteink rámutattak arra, hogy a rAd-sal CD80

expresszióra kényszerített, majd fejlődő timocitákkal reaggregáltatott tímusz epiteliális sejtek „lipid tutajok” kialakulását indukálják a timocitákban, amelynek következményeként megnövekszik az apoptózis és csökken a pozitív szelekció. Megállapítottuk tehát, hogy a ko-stimulációs molekulák jelenléte módosítja a TCR-függő szelekciós jelek erősségét.

Noha a ko-receptorok jelenléte, illetve hiánya támpontot nyújtott a szelekciós jelek erősségét meghatározó folyamatok eredetére, a koncentráltan megjelenő jelátviteli molekulák a timocita-epitélium érintkezési felületen nem adtak intracelluláris magyarázatot a szelekciós jelek erőssége között fellépő különbségekre.

Hogy a szöveti környezetből származó túlélést, illetve sejthalált indukáló sejten belüli jelek közötti különbségeket azonosítani tudjuk, két, a periférián „high avidity” jelet utánzó és ezért T-sejtaktivációt előidéző faktort, anti-CD3 ϵ ellenanyagot és concanavalin A (ConA)-t alkalmaztunk. Azért esett a választásunk az ellenanyagra és ConA-ra, mert fejlődő timocitákra más hatást gyakorolnak, mint perifériális T-sejtekre. Míg az anti-CD3 ϵ ellenanyag a DP timociták apoptotikus halálát idézi elő, addig ConA kezelésük pozitív szelekciót és következképpen túlélést indukál. A kísérleteket intakt embrionális (E15) tímusz lebenyekben végeztük annak bizonyítását követően, hogy mind az ellenanyag, mind a ConA bediffundálnak a lebenyekbe. Így a két anyag hatását az amúgy érintetlen szöveti mikrokörnyezetben vizsgálhattuk. Az anti-CD3 ϵ ellenanyag és a ConA hatása közötti különbség molekuláris szinten már koránt sem bizonyult annyira egyértelműnek, mint a fejlődő T-sejtekre kifejtett szelekciós hatásuk. Korábbi kísérletek bizonyították, hogy a timociták TCR által indukált apoptotikus folyamatai során a nur77 (Cheng 1997; Winoto 1997) transzkripció faktor expressziója megnő. Meglepő módon azonban mind az anti-CD3 ϵ ellenanyag, mind a ConA növelte a nur77 expresszióját megközelítően azonos szinten. Továbbá, a szelekciós folyamatok megindulását jelző, mind a negatív, mind a pozitív szelekció során expressziós csökkenést mutató tcf1 génre, gyakorlatilag azonos hatással voltak, csökkentve annak transzkripcióját.

Korábbi kísérleteinkben a TCR-epitélium konjugációjának helyére akkumulálódott számos kináz jelenlétéből arra következtettünk, hogy esetleg a lipid „second-messenger”-ek felszabadulása lehet más a két hatóanyag jelenlétében, amely aktívan módosíthatja a túlélési és apoptotikus jeleket. A külső receptor-ligand interakciók differenciált lipid „second-messenger” indukciója módosult kináz aktivitást eredményezhet, mely a túlélési folyamatokban döntő szerepet játszó Akt/PKB enzim differenciált aktiválását idézheti elő, megváltoztatva ezzel a túlélés, illetve a sejthalál kiváltását indukáló jelek arányát. A feltételezés kísérletes bizonyításához a timociták anti-CD3 ϵ és ConA kezelését követően a sejt lizátumból immunprecipitáltuk az Akt/PKB enzimet, majd aktivitásméréssel bizonyítottuk, hogy a ConA kezelés következtében az enzim aktivitása megközelítően kétszeresére nő az anti-CD3 ϵ -nal kezelt timocitákból izolált Akt/PKB aktivációs értékeivel összehasonlítva.

Ebből az eredményből arra következtettünk, hogy az Akt/PKB fontos szerepet tölthet be a túlélési folyamatok megindításában. További kísérleteink rávilágítottak arra, hogy a ConA sokkal nagyobb mértékben indukálja a Bad molekula foszforilációját, mint az anti-CD3 ϵ kezelés, amelynek következménye lehet az anti-apoptotikus BclXL fokozott felszabadulása. Ezen túlmenően a ConA ellentétben az anti-CD3 ϵ ellenanyag hatásával, idővel a bad-gén átíródásának teljes gátlását eredményezte, miközben egy másik anti-apoptotikus molekula, a Bcl2 foszforilációját és ezzel aktivitását növelte. Mivel a Bcl2 molekula foszforilációja gyakorlatilag azonnali, foszfatázok (PP2A) által katalizált de-foszforilációhoz vezet, megvizsgáltuk, hogy a de-foszforiláció miért nem következik be ConA kezelést követően?

Mivel a PP2A foszfatázt ceramidok aktiválják, kémiai inhibítorokkal gátoltuk mind a savas sfgingomielináz (SR33557), mind a ceramid szintáz (fumosin) aktivitását, majd megvizsgáltuk a DP timociták túlélését anti-CD3ε ellenanyag, illetve ConA kezelést követően.

Várakozásainkkal ellentétben, a ceramid termelésének gátlása nem akadályozta meg az ellenanyag által kiváltott timocita depléciót. A ceramid termelés gátlása viszont gátolta a ConA által kiváltott túlélési jelátvitelt, ami arra utal, hogy a ConA által indukált túlélési folyamat nagymértékben függ a savas sfgingomielináz aktivitásától. Ennek következtében, és a korábbi elméletünkkel ellentétben nem a PP2A foszfatáz, hanem a proliferációs folyamatokat is szabályozó (Kolesnik 1995) PKC ζ aktiválásához elengedhetetlen (Lozano 1994) ceramid-termelés játszik fontos szerepet.

További kísérleteink bizonyították, hogy a timociták túlélését, differenciációját, öregedését erősen befolyásolja a TCR vagy Notch jelátvitel. Azonban a Notch és TCR függő jelátvitel nem elegendő a timociták kifejlődéséhez. A Wnt jelátvitel is fontos szerepet tölt be a T-sejtek érési és differenciálódási folyamataiban. A tisztított timocita és tímuszepiteliális sejtpopulációkon végzett génexpressziós vizsgálatok rávilágítottak arra, hogy a Wnt rendszer ligandjait elsősorban a tímusz epiteliális sejtek termelik. Ellentétben azonban a Notch jelátvitellel, ezek a ligandok szekretáltak és a T-sejteken a tíz receptoruk közül csak limitált számú Fz található. A timociták által különböző fejlődési lépésekben más-más Fz receptor jelenlétét azonosítottuk, amiből arra következtettünk, hogy a Wnt jelátvitel jól körülhatárolható folyamatokat szabályoz a timociták fejlődése és differenciálódás során.

Kísérleti eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a Wnt jelátvitelre a tímuszban fejlődő timocitáknak elsősorban a DN-DP fejlődési átmenetnél van szükségük. Annak megállapítására, hogy csak a sejtek túléléséhez szükséges vagy a timociták fejlődési lépéseire is elengedhetetlen-e a kanonikus Wnt jelátvitel, a β-katenin-függő jeltovábbítás módosítására volt szükség. A sejtekben fiziológiásan is jelenlévő β-katenin inhibítor, ICAT, génjének számos példányát rekombináns retrovírussal juttattuk a fejlődő timocitákba, ezzel elérve azt, hogy a fejlődő timociták nagy százalékában igen magas szinten expresszálódjon a β-katenin jelátvitelt gátló molekula.

Miután bizonyítottuk, hogy az ICAT aktív, a rekombináns retrovírussal módosított tisztított DN timocitákat, illetve tisztított DP timocitákat külön-külön reaggregált tímusz kultúrákban tenyésztettük tovább. Ezekben a kultúrákban minden jel, a TCR-MHC jelátviteltől, a Notch szignálokra keresztül, a Wnt ligandokon és receptorokon át rendelkezésre állt a timociták fejlődéséhez és differenciálódásához. Az egyetlen kivételt, a kanonikus Wnt jelátvitel jelentette a timocitákban belül, amelyet hatékonyan blokkolt az inhibítor jelenléte. A DN timocitákkal végzett kísérletek bizonyították, hogy a Wnt jelátvitel a DN-ból a DP fejlődési állapotba való átmenethez szükséges. Erre már a Fz receptorok expressziós mintázatának vizsgálatából is következtetni lehetett, hiszen a timociták Wnt receptorokat elsősorban a DN3, DN4 és DP fejlődési állapotban expresszálják. Az inhibítor jelenlétében végzett kísérletek rámutattak arra, hogy az ICAT-et expresszáló sejtek a DN, illetve a DN⁺TCRβ⁺, a DP fejlődési állapotot közvetlenül megelőző differenciálódási szinten rekedtek meg a fejlődésben.

A DP timocitákkal végzett kísérletek rámutattak arra is, hogy a további differenciálódási szakasz nem igényli a kanonikus Wnt jelátvitelt, hiszen a timociták SP (CD4⁺8⁻ helper és CD4⁺8⁺ citotoxikus) sejtekké értek a kanonikus Wnt inhibítor jelenlétében.

A timociták fejlődését vizsgálva megállapítottuk, hogy a timociták proliferációjában és differenciációjában fontos szerepet betöltő jelátviteli folyamatok aktiválási jelei a tímusz

epitéliumból származnak. Ezek nélkül, azaz Notch avagy Wnt jelek nélkül, a timociták nem érik el azt a fejlődési szintet, amely elengedhetetlen a receptorláncok génjeinek átrendeződéséhez. Amennyiben nincsenek működőképes receptorok a fejlődő timociták felszínén, úgy a funkcióképtelen sejtek apoptotikus sejthalállal elpusztulnak. A funkcióképes TCR kialakulása után azonban minden egyéb jelet felülírnak a TCR függő szelekciós szignálok.

5.3. Jelátvitel a tímusz atrófiája során

Annak megértése érdekében, hogy a T-sejtek fejlődését támogató tímusz epitélium hogyan alakul ki, a Wnt jelátvitel alaposabb megértése tűnt a legcélravezetőbb kutatási irányynak. A Wnt jelátvitel különösen fontosnak ígérkezett, mivel a Wnt4 jelátviteli molekula hiányában a tímusz epitélium karakterét kialakító transzkripciós faktor, FoxN1 transzkripciója nem indul meg, azaz a tímusz epitélium nem alakul ki. A tímusz epitéliumban zajló jelátvitel megértéséhez azonban olyan kísérleti rendszer kialakítására volt szükség, amelyben a célgénnek azonosításával a Wnt jelátvitel jól nyomon követhető. Ehhez olyan komplex „microarray” kísérleteket végeztünk, amelyekben a szelektív Wnt célgénnek azonosítását kívántuk elvégezni. A kísérletekhez a Fz receptorból származó jelek továbbításában fontos szerepet betöltő PKC (PKC δ) molekula módosulatait alkalmaztunk. Ezek a kutatások végül teljesen új irányt adtak a jelátviteli rendszerek és a tímuszban zajló folyamatok megismerésének.

5.3.1. Fiziológiás tímusz atrófia

A tímusz epiteliális sejtekben végzett Wnt jelátviteli vizsgálatok, melyekhez módosított aktivitással rendelkező PKC δ molekulákat is használtunk, a korábbi évtizedekben „thymopoietin”-nek nevezett molekula génexpressziós szintjének Wnt függő változásait azonosították. A gén mai neve lamin asszociált protein 2 α , azaz LAP2 α , mely fontos szerepet tölt be sejtek, különösen a mezenhimális eredetű fibroblasztok adipoid irányú transzdzifferenciációjának szabályozásában. Ezzel az eredménnyel felmerült annak a lehetősége, hogy egy olyan jelátviteli rendszer néhány elemét sikerült azonosítanunk, amely fontos szerepet játszik az öregedés folyamán lezajló tímusz atrófia szabályozásában.

A fenti feltételezés alátámasztására megkezdjük az öregedő vad típusú Balb/c egerek tímuszának vizsgálatát, mely rávilágított arra, hogy az öregedés egy bizonyos fázisában az epiteliális és mezenhimális markerek ko-lokalizálnak. Ez arra engedett következtetni, hogy a korábbi elméletekkel ellentétben az öregedés során a tímusz epiteliális sejtek nem valószínű, hogy apoptózissal elpusztulnak és az így támadó szövethiányt a környezetből beáramló zsírsejtek töltik meg. Sokkal inkább úgy tűnik, hogy az epiteliális sejtek először epiteliális-mezenhimális tranzíción, azaz EMT-n esnek át, amelynek következményeként a már jól ismert fibroblaszt-adipocita transzdzifferenciációra is képesek lesznek.

A tímusz epitéliumban zajló öregedési folyamatok molekuláris vizsgálatának megkezdésekor a Wnt4, illetve célgénje, a tímusz epitélium karakterét meghatározó FoxN1 transzkripciós faktor expressziós vizsgálatára koncentráltunk. Öregedés során mind a Wnt4, de különösen a FoxN1 expressziója és az epiteliális sejtek differenciációs szintjét jelző E-kadherin csökkenést mutatott, míg ezzel párhuzamosan megnövekedett a LAP2 α szintje, és a zsírosodást szabályozó PPAR γ és ADRP transzkripciója.

A kezdeti kísérletekben azonosított molekulák a tímusz epitélium elzsírosodási folyamataiban betöltött szerepét transzgén sejtvonalakban végzett kísérletekkel támasztottuk alá. Míg a LAP2 α gén tranziens expressziója megnövekedett PPAR γ és ADRP expresszióhoz vezetett, addig a Wnt4 expressziós szintjének növekedése mind a PPAR γ -t, mind az ADRP-t a kontroll szint alá csökkentette.

Ezzel bizonyítottá vált, hogy a kor előrehaladtával lecsökkenő Wnt4 szint valószínűleg igen nagy fontossággal bír, hiszen lehetővé teszi a tímusz epitélium epiteliális karakterének elvesztését és ezzel az EMT kialakulását. Ez, párhuzamosan az adipoid transzdifferentiációt szabályozó LAP2 α szintjének növekedésével, az öregedő tímusz elzsírosodásához vezet.

5.3.2. Glükokortikoidok (GC) által indukált tímusz atrófia

Egerekben a gyulladáscsökkentő terápiában gyakran alkalmazott, glükokortikoid kezelését követően mind a Wnt4, mind a FoxN1 lecsökken és huzamos kezelést követően az expresszós szint nem tért vissza a kontroll szintre, ami azt jelzi, hogy a GC kezelés felgyorsult és visszafordíthatatlan tímusz epiteliális öregedéshez vezet. Ennek következményeként a timociták negatív szelekciójának mikrokörnyezete károsodik, amelynek végeredményeként a GC kezelés megszüntetését követően az autoreaktív T-sejtek felszaporodhatnak, ami növeli az autoimmun betegségek kialakulásának kockázatát.

Mivel a LAP2 α által szabályozott elzsírosodási folyamat felismerése a módosított PKC δ aktivitás eredményeként jött létre, a jelátviteli folyamatok vizsgálatára külön figyelmet fordítottunk és a felmerülő kérdéskör vizsgálatát a Fz4, Fz6 és a PKC δ gének expressziós szintjének vizsgálatával kezdtük. Meglepő módon mindhárom gén (Fz4, Fz6 és a PKC δ) emelkedett expressziót mutatott mind mRNS, mind protein szinten az öregedés előrehaladtával. Azonban, amíg a fiatal tímuszban a Fz4 és Fz6 receptorok elsősorban medulláris lokalizációt mutattak, addig a korosodó állatok tímuszában a kortexben is megnövekedett a receptorok expressziója.

Ellentétben a receptor-fehérjék tímusz epitéliumban történő megoszlás-változásával, a PKC δ fehérje a fiatal egerekben elsősorban a kortikális epitéliumban található, míg a kor előrehaladtával az expresszós szint növekszik a medulláris régióban is.

A kísérleti eredményeink arra engedtek következtetni, hogy a PKC δ fontos szerepet játszik az öregedési jelek transzdukciójában, de arra a kezdeti elemzések nem adtak, magyarázatot, hogy milyen szinten kapcsolódik be a PKC δ az öregedési folyamatok szabályozásába. Ahhoz, hogy a PKC δ szerepére fényt deríthessünk, a sejtekben a PKC δ enzim aktivitását módosítottuk. Az aktivitás növelése érdekében a PKC δ -t túlexpresszáztattuk a TEPI sejtvonalon. A vad típusú PKC δ gént retrovirális úton juttattuk a sejtekbe. PKC δ expresszió csökkentéséhez viszont kereskedelmi forgalomban is beszerezhető siPKC δ -t használtunk. A PKC δ túlexpresszáztatása Wnt4 hatására nem növelte a Wnt4 célgén, a CTGF expresszióját, míg a PKC δ enzim szintjének csökkenése szignifikáns CTGF expresszió növekedéshez vezetett. Az eredmények alapján arra következtettünk, hogy a PKC δ feltehetően egy negatív visszacsatolási rendszer része és a kanonikus Wnt jelátvitel célgénjeinek átíródásához vezető jelátviteli folyamatokban csak sokkal kisebb mértékben vagy egyáltalán nem vesz részt.

A receptorok immunprecipitációjával kontroll és Wnt4 kezelt sejtekben megvizsgáltuk, hogy a Wnt receptorokhoz kapcsolható-e a jelátvitel szempontjából fontos két molekula, a PKC δ és a Dvl.

Az eredmények alátámasztani látszottak a kezdeti feltételezéseinket, miszerint az öregedés kezdetén a Fz4 receptor szintje nő és ezzel párhuzamosan megnövekszik a Wnt4 célgének átíródása. E mellett növekszik a negatív visszacsatolásban résztvevő jelátviteli molekulák jelenléte is a rendszerben, gátolva ezzel a kanonikus Wnt jelátvitelt. Ennek eredményeként hiába erősödik a kanonikus Wnt jelek extracelluláris jelenléte, az intracelluláris szabályozás nem engedi a kanonikus Wnt jelek által indukált proliferációs és egyéb, a sejtek túléléséért felelős gének átíródását. Ezzel a tímusz epitéliális őssejtek proliferációs képessége, végül száma is lecsökken, amely az öregedő epitéliális hálózat regenerációjának gátlásához vezet.

A jelátviteli rendszerek összegzésekképpen megállapíthatjuk, hogy az öregedési folyamat félidejében, amikor még a Wnt4 expresszió csökkenése nem kifejezett, megindul a Wnt4 receptorok expressziós szintjének növekedése. Ez a folyamat nem csak a korábban ezeket a receptorokat expresszáló epitéliális alcsoportokra jellemző, hanem a tímusz epitéliumra általában. A megnövekedett receptorexpresszióból származó jelátvitel megindulása értelemszerűen növeli a kanonikus célgének átíródását. Ennek a folyamatnak azonban a lineáris logika ellentétje az eredmény, hiszen a cél gének közül a negatív visszacsatolási rendszerben játszik szerepet például a CTGF, amely szekrécióját követően a Fz8 receptorhoz is kapcsolódhat. Feltehetően egy PKC ζ indukálta mechanizmuson keresztül aktiválja a GSK3 β enzimet, amely a β -katenin molekulát foszforilálja, és így a β -katenin érzékennyé válik a proteosomális degradációra. Ezzel csökken a β -katenin szint, amellyel a kanonikus jelátvitel célgénjeinek átíródása is csökken. Ezzel párhuzamosan erősödnek a Fz6 gátló receptorból származó jelek is. Ez a folyamat annak a következménye, hogy a megnövekedett receptor expresszióhoz megnövekedett PKC δ szint társul, amely preferenciálisan a Fz6 receptorhoz kapcsolódik, növelve ezzel a negatív jelek továbbításának arányát. Így a kanonikus Wnt jelátvitel két úton is gátlás alá kerül: a β -katenin szint csökkenésével és a TCF transzkripciós faktor foszforilációjával. Így, ha a β -katenin be is jut a magba, az aktív transzkripciós komplex összeállásának esélye rohamosan csökken, hiszen a TCF foszforilált állapotban nem képes a β -kateninhez kötődni. Ennek a jelátviteli folyamatnak a következménye, hogy a kanonikus jelátviteli jelekre érzékeny FoxN1 transzkripciós faktor átíródása drasztikusan lecsökken. A lecsökkent FoxN1 szint lehetővé teszi az epitéliális sejtek dedifferenciációját, majd fibroblaszt-jellegű átalakulását. Az epitéliális-mezenhimális tranzíción átesett sejtekben, ahol a zsírsejt irányú átalakulást szabályozó molekulák (LAP2 α , PPAR γ , ADRP) szintje növekszik, az adipoid transzdzifferenciáció már visszafordíthatatlanná válik.

6. EREDETI TUDOMÁNYOS FELISMERÉSEK ÖSSZEFOGLALÁSA ÉS GYAKORLATI ALKALMAZHATÓSÁGA

A hagyományos kísérleti megközelítési módszerek a jelátviteli folyamatok fiziológias hatásainak felderítésére egyre kevésbé alkalmazhatók. A szervezetben lezajló jelátviteli folyamatok nem érthetők meg ugyanis kizárólag sejtvonalakon végzett kutatásokkal, hiszen minden fiziológias válaszreakció a szövetek és sejtek reciprokális egymásra hatásának következtében keltett, receptor-ligand kapcsolatból származó intracelluláris jelek eredőjeként jön létre. Ezért az immunrendszer speciális sejtjeinek perifériális aktivációja, avagy fejlődése közben végbemenő osztódási vagy differenciálódási illetve öregedési jelátviteli folyamatairól csak komplex szöveti rendszerek felállítása mellett kaphatunk átfogó képet. A komplex szöveti rendszereken túlmenően nagyon fontos a primer sejtek alkalmazása is, hiszen a fiziológias folyamatokról csak primer szövetek sejtjei szolgáltatnak megbízható adatokat. Az általános jelátviteli folyamatok megismerésén túlmenően a szövet-specifikus jelátviteli rendszerek megismerése igen nagy fontossággal bír, hiszen terápiás célzattal csak a jól ismert folyamatok manipulálhatóak biztonsággal.

Munkánk során a különféle immunsejtek komplex szöveti rendszerekben történő vizsgálata kiemelkedő fontosságú összefüggések felismeréséhez vezetett. Megállapítottuk, hogy pusztán a PKC család tagjainak specifikus manipulálása nem lehet hatékony terápiás célpont, hiszen az enzimek közötti hasonlóság és funkcionális redundancia nem teszi ezt lehetővé. Arra is rávilágítottunk, hogy egyedi PKC molekulák számos, akár ellentétes előjelű, jelátviteli folyamatban párhuzamosan is részt tudnak venni, ezért funkcióikat csak a jelátviteli rendszerek eredőjeként értelmezhetjük. A sejten belüli jelátviteli folyamatok komplexitásával vetekedik az extracelluláris jelek sokasága, amelyek az intracelluláris jelátvitel megindításával készítetik specifikus válaszreakcióra a sejteket, szöveteket. A szövetek és a szöveti regenerációjukhoz szükséges progenitor vagy őssejtjeik fenntartásában központi szerepet játszik a négy fő jelátviteli molekula család és köztük fellépő interakciók sokasága, melyben a Wnt család tagjai kiemelt helyet foglalnak el.

A Wnt-ok nem csak a tímusz mikrokörnyezetét hozzák létre, ahol a speciális környezetben fejlődnek és differenciálódnak a T-sejtek, hanem a Wnt-ok a fejlődő timocitákra is közvetlen hatást gyakorolnak, befolyásolva életképességüket és fogékonyságukat a differenciációs jelekre. A DP sejtekké differenciálódott T-sejtek a tímusz mikrokörnyezetben szelektálódnak, melyhez mint kimutattuk, a tímusz epitélium felszínén MHC-hez kötött antigén komplex és a funkcióképes TCR-rel rendelkező T-sejt direkt interakciója szükséges. A pozitív szelekciót követően még egy szelekciós lépés vár a fejlődő T-sejtekre a dendritikus sejtekben dús medulláris mikrokörnyezetben. A különféle antigén felismerő képességgel rendelkező T-sejtek receptor specificitása a perifériás immunrendszerben döntő fontossággal bír kórokozók elleni immunválasz során, avagy túlérzékenységi és autoimmun betegségek kialakulásában.

Eredményeink rámutattak, arra is, hogy környezeti tényezők, illetve receptor-ligand interakciók megváltozása vezethet a TCR-ből származó „high avidity” azaz apoptotikus jelek módosításához, ami a fejlődő timociták túléléséhez és potenciálisan autoreaktív T-sejtek feldúsulásához vezet.

Kísérleteink eredményei kapcsán a tímusz öregedésére vonatkozó általános dogmák is megkérdőjelezhetővé váltak. Eddigi feltételezések szerint az öregedő tímuszban a tímusz epitélium apoptotikus sejthalála következtében a megüresedő helyet zsírsjtek migrációjával

tölti fel a szervezet. A kísérletekkel is alátámasztott következtetéseink azonban teljesen új alapokra helyezik a thímusz adipoid atrófiájának molekuláris hátterét. Bizonyítottuk, hogy speciális molekuláris változások lehetővé teszik a thímusz epitélium dedifferenciációját és zsírsejteké történő átalakulását. Ez a folyamat olyan komplex jelátviteli szabályozás alatt áll, amelyet más kutatócsoportoknak még nem sikerült azonosítaniuk. Ennek megfelelően a mi munkánk úttörő jellegű nem csak a thímusz, de az egész immunrendszer öregedésének megértése szempontjából is.

Az immunrendszer jelátviteli folyamatainak megértése nagy jelentőséggel bír, hiszen az egészséges szervezetben lezajló fiziológiás folyamatok leírása képezi az alapját minden, a betegségekben megváltozott jelátviteli szabályozás megismerésének, terápiás megközelítési módok kidolgozásának, illetve farmakológiai célpontok azonosításának és gyógyszerhatóanyagok kifejlesztésének.

Az immunológiai folyamatok megértésére tett erőfeszítések különösen fontosak az öregedés szempontjából. Nem csak Magyarország, de az egész fejlett világ népessége rohamosan öregszik, melynek az egyénre és a társadalomra nehezedő anyagi terhei a megnövekedett egészségügyi költségek terén is jelentkeznek. Az immunrendszer öregedésének lassítása, az idősek hatékonyabb immunizálhatóságát tenné lehetővé, és párhuzamosan növelné az immunológiai válaszkésztséget. Ezzel csökkenthetővé válna a fertőző betegségek terjedése, súlyos daganatos és autoimmun kórképek kialakulása, melynek közvetlen következménye a költséges kórházi kezelést és ápolást igénylő betegek számának csökkenése is.

A T-sejtek fejlődési lépéseinek megismerése mellett a sejttípusok egymásba való átalakíthatóságának jelentőségét sem szabad alábecsülni. Az öregedés kapcsán további jelátviteli vizsgálatainkban az epitéliális-mezenhimális tranzíció fordítottjának, a mezenhimális-epitéliális átalakulás szabályozásának molekuláris hátterét kívánjuk felderíteni. Ehhez a saját kísérleteinkben felismert szabályozó molekulákra koncentrálnunk elsősorban, melyhez sikerült megnyernünk magyar és finn kis és közép vállalatokat is. Elsősorban a Wnt4 molekula thímusz epitéliumra kifejtett protektív hatását vizsgáljuk tovább, illetve olyan fehérje interakciók kidolgozására igyekszünk koncentrálni, amely a LAP2 α adipoid transzifferenciációt indukáló hatását csökkenti. A terápiás célpontok meghatározása nem csak az immunrendszer fiziológiás öregedésének sebességét csökkenthetné, hanem reményt adhat krónikus betegségek szteroid kezelése következtében felgyorsult öregedési folyamatok lassítására vagy visszafordítására is.

A kísérletek kivitelezéséhez használt komplex szöveti rendszerek kidolgozása kapcsán a „tissue engineering” területén is hasznosítható újításokat eredményeztek munkáink. Kísérleteink alátámasztották, hogy az általunk kidolgozott kísérleti rendszerek és a szövetek közötti interakciót szabályozó fő jelátviteli családok szervezett együttműködése magasan szervezett szövetek előállítását teszi lehetővé *in vitro* körülmények között. Az így előállított szöveti rendszerek mind jelátviteli kísérletek kivitelezésére, mind gyógyszerek tesztelésére, mind transzplantáció-kész szövetek előállítására alkalmasak. Ezekkel az eredményekkel kapcsolatosan jelenleg három szabadalmi beadvány és négy kutatási cikk várja a bírálók döntését.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., and Kemler, R. (1997). "b-Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway." EMBO J. **16**: 3797-3804.
- Afford, S. C., et al. (1992). "The induction by human interleukin-6 of apoptosis in the promonocytic cell line U937 and human neutrophils. ." J.Biol.Chem. **267**: 21612-21616.
- Altman, A., M. Villalba, et al. (2003). "Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. ." Immunol Rev. **192**:53-63.
- Anderson, G., K. L. Anderson, et al. (1997). "Fibroblast dependency during early thymocyte development maps to the CD25+ CD44+ stage and involves interactions with fibroblast matrix molecules. ." Eur J Immunol. **27**(5):1200-6.
- Anderson, G. and E. J. Jenkinson (1995). "The role of the thymus during T-lymphocyte development *in vitro*." Semin. Immunol. **7**: 177-183.
- Anderson, G. and E. J. Jenkinson (2007). "Fetal thymus organ culture." CSH Protoc. **pdb.prot4808**.
- Anderson, G., W. Jenkinson, et al. (2006). "Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. ." Immunol. Rev. **209**: 10-27
- Anderson, G., J. J. T. Owen, et al. (1994). "Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes *in vitro*." J. Exp. Med. **179**: 2027-2031.
- Anderson, G., J. Pongracz, et al. (2001). "Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling." Eur. J. Immunol. **31**: 3349-3354.
- Anderson MS, Venanzi ES, et al. (2005). "The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance." Immunity **23**: 227-239.
- Aydar, Y., P. Balogh, et al. (2004). "Follicular dendritic cells in aging, a "bottle-neck" in the humoral immune response. ." Ageing Res Rev. **3**(1): 15-29.
- Aydar, Y., P. Balogh, et al. (2003). "Altered regulation of Fc gamma RII on aged follicular dendritic cells correlates with immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif signaling in B cells and reduced germinal center formation. ." J Immunol. **171**(11): 5975-87.
- Balciunaite, G., M. Keller, et al. (2002). "Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice." Nat. Immunol. **3**(11): 1102-1108.
- Berry, N. and Y. Nishizuka (1990). "Protein kinase C and T cell activation." Eur J Biochem. **189**(2): 205-214.
- Blackburn, C. and N. Manley (2004). "Developing a new paradigm for thymus organogenesis." Nat Rev Immunol **4**(4): 278-289.
- Blitzer, J. T. and R. Nusse (2006). "A critical role for endocytosis in Wnt signaling. ." BMC Cell Biol. **7**(28).
- Blomgren, H. and B. Andersson (1970). "Characteristics of the immunocompetent cells in the mouse thymus: cell population changes during cortisone-induced atrophy and subsequent regeneration." Cell Immunol **1**: 545-560
- Boersma, W., I. Betel, et al. (1979). "Thymic regeneration after dexamethasone treatment as a model for subpopulation development." Eur J Immunol **9**: 45-52.
- Bondeva, T., Pirola, L., Bulgarelli-Leva, G., Rubio, I., Wetzker, R., Wymann, M.P. (1999). "Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K to the protein kinases PKB and MAPK." Science **282**: 293-296.
- Braiman, L., A. Alt, et al. (1999). "Protein kinase Cdelta mediates insulin-induced glucose transport in primary cultures of rat skeletal muscle." Mol Endocrinol. **13**(12):2002-12.
- Cardell, M., A. S. Landsend, et al. (1998). "High resolution immunogold analysis reveals distinct subcellular compartmentation of protein kinase C gamma and delta in rat Purkinje cells" Neuroscience **82**(3): 709-725.
- Chantry, D., M. Turner, et al. (1989). "Interleukin 7 (murine pre-B cell growth factor/lymphopoietin 1) stimulates thymocyte growth: regulation by transforming growth factor beta." Eur. J. Immunol. **19**(4): 783-786.
- Cheng, E. C., Chan, K.M. Cado, D., and Winoto, A. (1997). "Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis." The EMBO J. **16**: 1865-1875.
- Clemens M.J., I. Trayner, et al. (1992). "The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation." J Cell Sci. **103** (Pt 4): 881-887
- Degnan, B. M., C. J. Hawkins, et al. (1989). "Novel cytotoxic compounds from the ascidian *Lissoclinum bistratum*." J Med Chem. **32**(6): 1354-1359.
- Fletcher, A. L., T. E. Lowen, et al. (2009). "Ablation and regeneration of tolerance-inducing medullary thymic epithelial cells after cyclosporine, cyclophosphamide, and dexamethasone treatment." J Immunol **183**: 823-831.
- Golan, T., A. Yaniv, et al. (2004). "The human frizzled 6 (HFz6) acts as a negative regulator of the canonical Wnt b-catenin signaling cascade." J. Biol. Chem. **279**(15): 14879-14888.

- Griffiths, G., B. Garrone, et al. (1996). "The polyether bistratene A activates protein kinase C-delta and induces growth arrest in HL60 cells." Biochem. Biophys. Res. Commun. **222**(3): 802-808.
- Grubeck-Loebenstein, B. (2010). "Fading Immune Protection in Old Age: Vaccination in the Elderly." J Comp Pathol **142** (Suppl 1): S116-119.
- Grusby, M. J., H. Auchincloss, Jr., et al. (1993). "Mice lacking major histocompatibility complex class I and class II molecules." Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90**: 3913-3917.
- Gschwendt, M., H. J. Müller, et al. (1994). "Rottlerin, a novel protein kinase inhibitor." Biochem Biophys Res Commun. **199**(1): 93-98.
- Hare, K., Pongracz J, et al. (2003). "Modeling TCR signaling complex formation in positive selection." J. Immunol. **171**: 2825-2831.
- Hare, K., J. Pongrácz, et al. (2002). "Induction of thymocyte positive selection does not convey immediate resistance to negative selection." Immunology **105**: 163-170
- He, T., A. Sparks, et al. (1998). "Identification of c-MYC as a target of the APC pathway." Science **281**(5382): 1509-1512.
- Helfrich, I., A. Schmitz, et al. (2007). "Role of aPKC isoforms and their binding partners Par3 and Par6 in epidermal barrier formation." J Invest Dermatol. **127**(4): 782-791.
- Henson, S. M., J. Pido-Lopez, et al. (2004). "Reversal of thymic atrophy." Exp Gerontol **39**: 673-678.
- Henson, S. M., R. Snelgrove, et al. (2005). "IL7 fusion protein that shows increased thymopoietic ability." J Immunol **175**: 4112-4118.
- Hernandez, A., N. Blace, et al. (2003). "Protein kinase M zeta synthesis from a brain mRNA encoding an independent protein kinase C zeta catalytic domain. Implications for the molecular mechanism of memory." J Biol Chem. **278**(41): 40305-40316.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S., Kikuchi, A. (1998). "Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK3b and b-catenin and promotes GSK-3b-dependent phosphorylation of b-catenin." The EMBO J. **17**: 1371-1384.
- Ishitani, T., S. Kishida, et al. (2003). "The TAK1-NLK Mitogen-activated protein kinase cascade functions in the Wnt-5a/Ca2+ pathway to antagonize Wnt/b-catenin signaling." Mol. Cell Biol. **23**(1): 131-139.
- Iso, T., L. Kedes, et al. (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." J Cell Physiol. **194**(3): 237-255.
- Jenkinson, E. J., G. Anderson, et al. (1992). "Studies on T cell maturation on defined thymic stromal cell populations in vitro. " J Exp Med. **176**(3):845-53.
- Jenkinson, W., E. Jenkinson, et al. (2003). "Differential requirement for mesenchyme in the proliferation and maturation of thymic epithelial progenitors." J Exp Med **198**(2): 325-332.
- Jepsen, L. V. and T. Skottun (1982). "A rapid one-step method for the isolation of human granulocytes from whole blood. ." Scand J Clin Lab Invest. **42**(3): 235-238.
- Jirousek, M., J. R. Gillig, et al. (1996). "(S)-13-[(dimethylamino)methyl]-10,11,14,15-tetrahydro-4,9:16,21-dimetheno-1H,13H-dibenzo[e,k]pyrrolo[3,4-h][1,4,13]oxadiazacyclohexadecene-1,3(2H)-dione (LY333531) and related analogues: isozyme selective inhibitors of protein kinase C beta." J Med Chem. **39**(14): 2664-2671.
- Kecha, O., F. Brilot, et al. (2000). "Involvement of insulin-like growth factors in early T cell development: a study using fetal thymic organ cultures." Endocrinology **141**(3): 1209-1217.
- Kestler, H. A. and M. Köhl (2008). "From individual Wnt pathways towards a Wnt signalling network." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **363**(1495): 1333-1347.
- Kim, G. H., J. H. Her, et al. (2008). "Ryk cooperates with Frizzled 7 to promote Wnt11-mediated endocytosis and is essential for *Xenopus laevis* convergent extension movements" J Cell Biol. **182**(6): 1073-1082.
- Kinoshita, N., H. Iioka, et al. (2003). "PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements." Genes Dev. **17**: 1663-1676.
- Kishimoto, A., Y. Takai, et al. (1980). "Activation of calcium and phospholipid-dependent protein kinase by diacylglycerol, it possible relation to phosphatidylinositol turnover." J Biol Chem. **255**(6): 2273-2276.
- Kolesnik, R., and Fuks, Z. (1995). "Ceramide: A signal for apoptosis or mitogenesis?" J. Exp. Med. **181**: 1949-1952.
- Kühl, M., K. Geis, et al. (2001). "Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca2+ signalling." Mech. Dev. **106**: 61-76.
- Kühl, M., L. C. Sheldahl, et al. (2000). "Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II is stimulated by Wnt and Rfizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*." J. Biol. Chem. **275**: 12701-12711.
- Kuro-o, M., Y. Matsumura, et al. (1997). "Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing." Nature **390**(6655):45-51.
- Kvell, K., T. Czömpöly, et al. (2010). "Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis" Transgenic Res **19**(1): 105-112.

- Kvell, K., Z. Varecza, et al. (2010). "Wnt4 and LAP2alpha as Pacemakers of Thymic Epithelial Senescence." PloS One **5**(5): e10701.
- Labalette, C., C. Renard, et al. (2004). "Interaction and functional cooperation between the LIM protein FHL2, CBP/p300, and beta-catenin." Mol. Cell Biol. **24**(24): 10689-10702.
- Lanner, F. and J. Rossant (2010). "The role of FGF/Erk signaling in pluripotent cells" Development **137**: 3351-3360.
- Le Good, J. A. and D. N. Brindley (2004). "Molecular mechanisms regulating protein kinase C ζ turnover and cellular transformation." Biochem J. **378**: 83-92.
- LGuatente, L. P., L. Partridge, et al., Eds. (2008). Molecular Biology of Aging. New York, Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Lin, Z., C. Gao, et al. (2008). "The pseudoreceptor BMP and activin membrane-bound inhibitor positively modulates Wnt/beta-catenin signaling." J Biol Chem **283**(48): 33053-33058.
- Liu, C., T. Ueno, et al. (2005). "The role of CCL21 in recruitment of T-precursor cells to fetal thymi." Blood **105**: 31-39.
- Liu, H., M. M. Fergusson, et al. (2007). "Augmented Wnt Signaling in a Mammalian Model of Accelerated Aging." Science **317**(5839): 803-806.
- Longo, K., J. Kennell, et al. (2002). "Wnt signaling protects 3T3-L1 preadipocytes from apoptosis through induction of insulin-like growth factors." J Biol Chem **277**: 38239-38244.
- Lotem, J., E. J. J. Cragoe, et al. (1991). "Rescue from programmed cell death in leukemic and normal myeloid cells." Blood **78**(4): 953-960.
- Lozano, J., Berra, E., Municio, M.M., Diaz-Meco, M.T., Dominguez, I., Sanz, L., and Moscat, J. (1994). "Protein kinase C isoform is critical for kB-dependent promoter activation by sphingomyelinase." J. Biol. Chem. **269**: 19200-19202.
- Luo, Q., Q. Kang, et al. (2004). "Connective tissue growth factor (CTGF) is regulated by Wnt and bone morphogenetic proteins signaling in osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells." J. Biol. Chem. **279**(53): 55958-55968.
- Lyons, J., U. Muller, et al. (2004). "Wnt-4 activates the canonical b-catenin-mediated Wnt pathway and binds Frizzled-6 CRD: functional implications of Wnt/b-catenin activity in kidney epithelial cells." Exp Cell Res **298**: 369-387.
- Malbon, C., H. Wang, et al. (2001). "Wnt signaling and heterotrimeric G-proteins: strange bedfellows or a classic romance?" Biochem. Biophys. Res. Commun. **287**(3): 589-93.
- Manley, N. R. (2000). "Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation." Sem. Immunol. **12**: 421-428.
- Mann, B., M. Gelos, et al. (1999). "Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas." Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **96**(4): 1603-1608.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stanek, P., Glinka, A., Niehrs, C. (2001). "LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins." Nature **411**(6835): 255-256.
- Marinova, T. T. (2005). "Epithelial framework reorganization during human thymus involution." Gerontology **51**: 14-18.
- Mellor, H. and P. J. Parker (1998). "The extended protein kinase C superfamily." Biochem J **332**: 281-292.
- Miyazono, K., S. Maeda, et al. (2005). "BMP receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk." Cytokine Growth Factor Rev. **16**: 251-263.
- Moon, R. T., B. Bowerman, et al. (2002). "The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin." Science **296**: 1644-1646.
- Moon, R. T., A. D. Kohn, et al. (2004). "WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies." Nat Rev Genet. **5**: 691-701.
- Moore, N. C., E. J. Jenkinson, et al. (1992). "Effects of the thymic microenvironment on the response of thymocytes to stimulation." Eur. J. Immunol. **22**: 2533-2537.
- Morita, S. Y., M. Kawabe, et al. (2004). "Ceramide in lipid particles enhances heparan sulfate proteoglycan and low density lipoprotein receptor-related protein-mediated uptake by macrophages." J Biol Chem. **279**(23): 24355-24361.
- Mulroy, T., McMahon, J.A., Burakoff, S.J., McMahon, A.P., and Sen, J. (2002). "Wnt-1 and Wnt-4 regulated thymic cellularity." Eur. J. Immunol. **32**: 967-971.
- Nateri, A. S., B. Spencer-Dene, et al. (2005). "Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development." Nature **437**(7056): 281-285.
- Ono, Y., T. Fujii, et al. (1988). "The structure, expression and properties of additional members of the protein kinase C family." J Biol Chem. **263**(14): 6927-6932.
- Ossipova, O., N. Bardeesy, et al. (2003). "LKB1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development." Nat Cell Biol. **5**: 889-894.

- Pandur, P., D. Maurus, et al. (2002). "Increasingly complex: new players enter the Wnt signaling network." Bioassays **24**(881-884).
- Pinson, K. I., Brennan, J., Monkley, S., Avery, B.J., Skarnes, W.C. (2000). "An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice." Nature **407**(6803): 535-538.
- Pongrácz, J., , et al. (1996). "Doppa induces cell death but not differentiation of U937 cells: evidence for the involvement of PKC-b1 in the regulation of apoptosis." Leukemia Res **20**(4): 319-326.
- Pongrácz, J., , et al. (1999). "The lipoxigenase product 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) is a selective inhibitor of classical PKC isoenzymes." Biochem. Biophys. Res. Commun. **256** (2): 269-272.
- Pongrácz, J., , et al. (1998). "Superoxid production in human neutrophils - evidence for signal redundancy and the involvement of more than one PKC isoenzyme class. ." Biochem. Biophys. Res. Commun. **247**(3): 624-629.
- Pongracz, J., K. Hare, et al. (2003). "Thymic epithelial cells provide Wnt signals." Eur. J. Immunol. **33**: 1949-1956.
- Pongracz, J., G. Johnson, et al. (1994). "The role of protein kinase C in myeloid cell apoptosis." Biochem. Soc. Trans. **22**: 593-597.
- Pongracz, J., S. Parnell, et al. (2003). "Con A and anti-CD3 induce differential gene expression and differential activation of the survival mechanism in developing double positive thymocytes." Mol. Immunol. **39**: 1013-1023.
- Pongrácz, J., P. Webb, et al. (1999). "Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3 mediated activation of PKC-d." J.Biol.Chem. **274** (52): 37329-37334.
- Pongracz JE, Parnell SM, et al. (2006). "Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development." Eur. J. Immunol. **36**(9): 2376-83.
- Pongracz JE and S. RA (2006). "Wnt signaling in lung development and diseases." Respiratory Res. **7**: 15.
- Qiang, Y. W., K. Walsh, et al. (2005). "Wnts induce migration and invasion of myeloma plasma cells." Blood **106**(5): 1786-1793.
- Radtke, F. and K. Raj (2003). "The role of Notch in tumorigenesis: oncogene or tumour suppressor?" Nat Rev Cancer **3**: 756-767.
- Rajotte, D., P. Haddad, et al. (1992.). "Role of protein kinase C and the Na⁺/H⁺ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3." J Biol Chem. **267**(14): 9980-9987.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**: 843-850.
- Ron, D. and M. G. Kazanietz (1999). "New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors." FASEB J. **13**(13): 1658-76.
- Schilham, M. W., Wilson, A., Moerer, P., Benaissa-Trouw, B.J., Cumano, A., Clevers, H.C. (1998). "Critical involvement of Tcf-1 in expansion of thymocytes." J.Immunol. **161**: 3984-3991.
- Schlessinger, K., E. J. McManus, et al. (2007). "Cdc42 and noncanonical Wnt signal transduction pathways cooperate to promote cell polarity." J Cell Biol. **178**(3): 355-361.
- Selbie, L. A., C. Schmitz-Peiffer, et al. (1993). "Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells." J Biol Chem. **268**(32).
- Sen, M. (2005). "Wnt signalling in rheumatoid arthritis." Rheumatology **44**: 708-713.
- Shen, S., A. Alt, et al. (2001). "PKCdelta activation: a divergence point in the signaling of insulin and IGF-1-induced proliferation of skin keratinocytes." Diabetes **50**(2): 255-264.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, et al. (1999). "The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway." Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **96**(10): 5522-5527.
- Staal, F. J. T., Burgering, B.M.T., van de Wtering, M., Clevers, H.C. (1999). "Tcf-1-mediated transcription in T lymphocytes: differential role for glycogen synthase kinase-e in fibroblasts and T cells." Int. Immunol. **11**: 317-323.
- Tago, K., T. Nakamura, et al. (2000). "Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel b-catenin-interacting protein." Genes&Development **14**: 1741-1749.
- Takai, Y., A. Kishimoto, et al. (1979). "A role of membranes in the activation of a new multifunctional protein kinase system." J Biochem **86**: 575-578.
- Talaber, G., K. Kvell, et al. (2011). "Wnt-4 protects thymic epithelial cells against Dexamethasone-induced senescence." Rejuvenation Research **14**(3): 241-248.
- Tamamura, Y., T. Otani, et al. (2005). "Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification." J Biol Chem. **280**: 19185-19195.
- Tanaka, Y., C. Mamalaki, et al. (1993). "In vitro negative selection of alpha beta T cell receptor transgenic thymocytes by conditionally immortalized thymic cortical epithelial cell lines and dendritic cells." Eur. J. Immunol. **23**(10): 2614-2621.

- Tsai, P. T., R. A. Lee, et al. (2003). "BMP4 acts upstream of FGF in modulating thymic stroma and regulating thymopoiesis." Blood **102**(12): 3947-3953.
- Van Gorp, C. L., M. R. Buchanan, et al. (1999). "Use of 13-HODE as a regulator of vascular biocompatibility and an inhibitor of cell hyperplasia. ." US Patent # 5,922,690.
- van Noort, M. and H. Clevers (2002). "TCF transcription factors, mediators of Wnt-signaling in development and cancer." Dev Biol. **244**: 1-8.
- Varecza, Z., K. Kvell, et al. (2011). "Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence." Mech. Ageing Dev. **132** (5): 249-256.
- Verbeek, S., Izon, D., Hofhuis, F., Robanus-Maandag, E., Riele, H.T., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Wilson, A., MacDonald, H.R., and Clevers, H. (1995). "An HMG-box-containing T cell factor required for thymocyte differentiation." Nature **374**: 70-74.
- Watters, D., K. Marshall, et al. (1990). "The bistratenes: new cytotoxic marine macrolides which induce some properties indicative of differentiation in HL-60 cells." Biochem Pharmacol. **39**(10): 1609-1614.
- Webb, P. R., K.-Q. Wang, et al. (2000). "Regulation of neutrophil apoptosis: A role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase. ." Apoptosis **5**: 451-458.
- Winoto, A. (1997). "Genes involved in T-cell receptor-mediated apoptosis of thymocytes and T-cell hybridomas." Seminars in Immunol. **9**: 51-58.
- Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., and Kikuchi, A. (1999). "Phosphorylation of axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3beta regulates its stability." EMBO J. **274**: 10681-10684.
- Yan, D., J. B. Wallingford, et al. (2001). "Cell autonomous regulation of multiple Dishevelled-dependent pathways by mammalian Nkd." Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. **98**(7): 3802-3807.
- Young, C. S., Kitamura, M., Hardy, S., Kitajewski, J. (1998). "Wnt-1 induces growth, cytosolic beta-catenin, and Tcf/Lef transcriptional activation in Rat-1 fibroblasts." Mol. Cell Biol. **18**: 2474-2485.
- Zamisch, M., B. Moore-Scott, et al. (2005). "Ontogeny and regulation of IL-7-expressing thymic epithelial cells." J. Immunol. **174**(1): 60-67.

dc_267_11

8. KÖZLEMÉNYEK

8.1. Publikációs mutatók:

Könyvfejezetek száma angol nyelven: 2
Tankönyvfejezetek száma angol nyelven: 4
Szerkesztett tankönyv angol nyelven: 1
Egyetemi jegyzet angol nyelven: 2
Egyetemi jegyzet magyar nyelven: 2

Eredeti közlemények száma: 32
Összesített IF: 111,493
Teljes idézetek száma: 1102
Független idézetek száma: 994
Hirsh index: 19
Független Hirsh index: 18

8.2. Az értekezés alapjául szolgáló eredeti közlemények

Varecza, Z., Kvell, K., Talabér, G., Miskei, G., Csongei, V., Bartis, D., Anderson, G., Jenkinson, E.J., Pongracz, J.E.: Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence.

2011. Mech. Ageing Dev. 132(5): 249-256. (IF: 4,857)

Talaber, G., Kvell, K., Varecza, Z., Boldizsar, F., Parnell, S.M., Jenkinson, E.J., Anderson, G., Berki, T., Pongracz J.E.: Wnt-4 protects thymic epithelial cells against Dexamethasone-induced senescence.

2011. Rejuvenation Research, 14(3): (IF: 4,225)

Kvell, K., Varecza, Z., Bartis, D., Hesse, S., Parnell, S., Anderson, G., Jenkinson, E.J., Pongracz J.E.: Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence.

2010. PLoS One, 5(5):e10701 IF: 4,411

Pongrácz, J.E., Parnell, S.M., Jones, T., Anderson, G., Jenkinson, E.J.: Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development.

2006. Eur.J.Immunol., 36:2376-2383 IF: 4,772

Hare, K., Pongrácz, J., Jenkinson, E., Anderson, G.: Modeling TCR Signaling Complex Formation in Positive Selection.

2003. J. Immunol., 171(6): 2825-2831. IF: 6,702

Pongrácz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G., Jenkinson, E.: Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes.

2003. Eur. J. Immunol., 33:1949-1956. IF: 4,536

Pongrácz, J., Parnell, S., Anderson, G., J.-P. Jaffrezou, Jenkinson, E.: Con A and α -CD3 induce differential gene expression és differential activation of the survival mechanism in developing double positive thymocytes.

2003. Mol. Immunol., 39:1013-1023. IF: 2,827

Hare, K., Pongrácz, J., Jenkinson, E., Anderson, G.: Induction of thymocyte positive selection does not convey immediate resistance to negative selection.

2002. Immunology, 105:163-170. IF: 2,729

Anderson, G., Pongrácz, J., Parnell, S., Jenkinson, E.J.: Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling.

2001. Eur. J. Immunol. 11:3349-3354. IF: 4,99

Pongrácz, J., Webb, P., Wang, K., and Lord, J.M.: Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3 mediated activation of PKC- δ .

1999. J.Biol.Chem. 274 (52):37329-37334. IF: 7,666

Pongrácz, J.; Lord, J.M.: The lipoxigenase product 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) is a selective inhibitor of classical PKC isoenzymes.

1999. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256 (2):269-272. IF: 3,161

Pongrácz, J.; Lord, J.M.: Superoxid production in human neutrophils - evidence for signal redundancy and the involvement of more than one PKC isoenzyme class.

1998. Biochem. Biophys. Res. Commun. 247(3):624-629. IF: 2,78

Pongrácz, J.; Deacon, E.; Johnson, G.D.; Burnett, D.; Lord, J.M.: Doppa induces cell death but not differentiation of U937 cells: evidence for the involvement of PKC- β 1 in the regulation of apoptosis.

1996. Leukemia Res. 20(4):319-326. IF: 1,423

Griffiths, G., Garrone, B., Deacon, E., Owen, P., Pongrácz, J., Mead, G., Bradwell, A., Watters, D., Lord, J.: The polyether bistratene A activates protein kinase C- δ and induces growth arrest in HL60 cells.

1996. Biochem. Biophys. Res. Commun. 222(3):802-808. IF: 2,872

Az értekezés alapjául szolgáló kutatási közlemények impakt faktora: 57,951

8.3. Az értekezés alapjául szolgáló összefoglalók

Molnár, T.F., Pongrácz, J.E.: Tissue engineering and biotechnology in general thoracic surgery.

2010. Eur.J.CardiThorac.Surg. 37(6): 1402-1410. IF: 2,293

Anderson, G., Jenkinson, W., Parnell, S.M., Jones, T., Kinsella, F., White, A., Pongrácz, J., Rossi, S., Jenkinson, E.: Establishment and functioning of intrathymic microenvironments.

2006. Immunol. Rev. 209:10-27. IF: 10,758

Pongrácz, J., Stockley, R.A.: Wnt signalling in lung development and diseases.

2006. Resp.Res. 7:15 IF: 2,335

Webb, P.R., Wang, K.-Q., Scheel-Toellner, D., Pongrácz, J., Salmon, M. és Lord, J.M.: Regulation of neutrophil apoptosis: A role for protein kinase C and phosphatidylinositol-3-kinase.

2000. Apoptosis 5:451-458. IF: 0,949

Az értekezés alapjául szolgáló összefoglalók impakt faktora: 16,335

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt faktora: 74,286

8.4. Az értekezés alapjául szolgáló első és utolsó szerzős közlemények

Varecza, Z., Kvell, K., Talabér, G., Miskei, G., Csongei, V., Bartis, D., Anderson, G., Jenkinson, E.J., Pongracz, J.E.: Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence.

2011. Mech. Ageing Dev. 132(5): 249-256. (IF: 4,857)

Talaber, G., Kvell, K., Varecza, Z., Boldizsar, F., Parnell, S.M., Jenkinson, E.J., Anderson, G., Berki, T., Pongracz J.E.: Wnt-4 protects thymic epithelial cells against Dexamethasone-induced senescence.

2011. Rejuvenation Research, 14(3):241-256 (IF: 4,225)

Kvell, K., Varecza, Z., Bartis, D., Hesse, S., Parnell, S., Anderson, G., Jenkinson, E.J., Pongracz J.E.: Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence.

2010. PLoS One, 5(5):e10701 IF: 4,411

Pongrácz, J.E., Parnell, S.M., Jones, T., Anderson, G., Jenkinson, E.J.: Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development.

2006. Eur.J.Immunol., 36:2376-2383 IF: 4,772

Pongrácz, J., Hare, K., Harman, B., Anderson, G., Jenkinson, E.: Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes.

2003. Eur. J. Immunol., 33:1949-1956. IF: 4,536

Pongrácz, J., Parnell, S., Anderson, G., J.-P. Jaffrezou, Jenkinson, E.: Con A and α -CD3 induce differential gene expression és differential activation of the survival mechanism in developing double positive thymocytes.

2003. Mol. Immunol., 39:1013-1023. IF: 2,827

Pongrácz, J., Webb, P., Wang, K., and Lord, J.M.: Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3 mediated activation of PKC- δ .

1999. J.Biol.Chem. 274 (52):37329-37334. IF: 7,666

Pongrácz, J.; Lord, J.M.: The lipoxigenase product 13-Hydroxyoctadecadienoic Acid (13-HODE) is a selective inhibitor of classical PKC isoenzymes.

1999. Biochem. Biophys. Res. Commun. 256 (2):269-272. IF: 3,161

Pongrácz, J.; Lord, J.M.: Superoxid production in human neutrophils - evidence for signal redundancy and the involvement of more than one PKC isoenzyme class.

1998. Biochem. Biophys. Res. Commun. 247(3):624-629. IF: 2,78

Pongrácz, J.; Deacon, E.; Johnson, G.D.; Burnett, D.; Lord, J.M.: Doppa induces cell death but not differentiation of U937 cells: evidence for the involvement of PKC- β 1 in the regulation of apoptosis.

1996. Leukemia Res. 20/4:319-326. IF: 1,423

Első és utolsó szerzős összefoglalók:

Molnár, T.F., Pongrácz, J.E.: Tissue engineering and biotechnology in general thoracic surgery.

2010. Eur.J.Cardiothorac.Surg. 37(6): 1402-1410. IF: 2,293

Pongrácz, J., Stockley, R.A.: Wnt signalling in lung development and diseases.

2006. Resp.Res. 7:15 IF: 2,335

Az első és utolsó szerzős közlemények összesített impakt faktora: 45,286

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik segítséget nyújtottak munkám során.

Köszönöm Berki Lili professzornak, mint tudományos diákkörös mentoromnak és diplomamunkám témavezetőjének, hogy irányt mutatott a biokémiai kutatásokban és mindig minden kísérletben a lehető legnagyobb precizitást várta el. Ez az elvárás kihatott a későbbi kutatási tevékenységemre.

Sokat köszönhetek Csaba Béla professzornak, aki támogatott az egyetemi doktori fokozatom megszerzésében és felkeltette érdeklődésemet az immunológia iránt.

Különösen sokkal tartozom Fésüs László professzornak, akadémikusnak, aki az egyetemi doktori értekezésem opponenseként az immunológia és jelátvitel új, akkor még igen kevésbé felderített területeire terelte érdeklődésemet.

Angliában eltöltött tizenhat év alatt igen sokat tanultam Janet Lord, Robert Stockley és Eric Jenkinson birminghami professzoroktól, akikkel hazatértem óta is kiváló munkakapcsolatot ápolok, és támogatásukra mindig számíthatok.

Köszönöm Németh Péter professzornak, hogy hazatérésemet egyengette és Szekeres-Barthó Júlia, ifj Kellermayer Miklós, Molnár F Tamás és Nyitrai Miklós professzoroknak, hogy kritikus, de baráti támogatásukkal megkönnyítették a beilleszkedésemet a magyar tudományos életbe.

Köszönöm még barátaimnak, Dr Katona Évának, Dr Holynski Máriának, Sonia Parnellnek, Mary Keen professzornak, hogy támogattak és bátorítottak.

Végül köszönöm a szüleimnek Dr Pongrácz Péternek és Zurányi Erzsébetnek, húgomnak, Évának, hogy mindig bíztak bennem és nem utolsó sorban férjemnek, Dr Miskei Györgynek és lányunknak Judith-Annának, hogy szeretetükkel, türelmükkel és megértésükkel mindig mellettem álltak.